

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Bc. Iveta Hradilová**

Příprava a studium vlastností kyanidhydratasy z *Aspergillus niger* a nitrilasy  
z *Arthroderma benhamiae*

Preparation and characterization of cyanide hydratase from *Aspergillus niger* and nitrilase  
from *Arthroderma benhamiae*

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Předkládaná diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením grantového projektu GA ČR P504-11-0394.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9. 5. 2014

Podpis:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli panu RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za odborné vedení. Dále Mgr. Janu Bláhovi za cenné rady, ochotu a čas, který mi při vypracovávání této práce věnoval.

Poděkování také patří Mgr. Zdeňkovi Kukačkovi (Laboratoř charakterizace molekulární struktury, MBÚ AV ČR, v.v.i.) za hmotnostní analýzu, Ing. Anně Rinágelové (Laboratoř biotransformací, MBÚ AV ČR, v.v.i.) za stanovení enzymové aktivity, RNDr. Jiřímu Pavlíčkovi (Laboratoři strukturní biologie, BTÚ AV ČR, v.v.i.) za umožnění provedení krystalizačních pokusů a RNDr. Vladimíru Kopeckému Jr., PhD. a RNDr. Kateřině Hofbauerové, PhD. (Fyzikální ústav, Matematicko-fyzikální fakulta, UK Praha) za analýzu vzorků pomocí dynamického rozptylu světla a Ramanovy spektroskopie.

## Abstrakt

Nitrilasy jsou dobře známy pro svou jedinečnou schopnost účinně katalyzovat nitrilové sloučeniny na odpovídající karboxylové kyseliny za uvolnění amoniaku. V některých případech mohou vznikat i amidy jako vedlejší produkty. Během chemické reakce nitrilasy nevyžadují přítomnost kofaktorů ani prostetických skupin na rozdíl od nitrilhydratas.

Tato práce je zaměřena na nitrilasu z vláknité houby *Arthroderma benhamiae* a kyanidhydratasu z organismu *Aspergillus niger* K10. Geny těchto vláknitých hub byly exprimovány pomocí plasmidu pET-30a(+) v bakteriích *Escherichia coli* BL21-Gold (DE3). Získané produkty byly purifikovány sérií iontově výměnných chromatografií a gelové filtrace a následně charakterizovány zejména se zřetelem na jejich oligomerní stav a využití pro proteinovou krystalografii.

K získání informací ohledně strukturního uspořádání jednotlivých proteinů byla použita elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu, gelová filtrace, analytická ultracentrifugace, hmotnostní spektrometrie, dynamický rozptyl světla a Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků.

**Klíčová slova:** nitrilasa, kyanidhydratasa, *Aspergillus niger*, *Arthroderma benhamiae*, kapalinová chromatografie

## Abstract

Nitrilases are well known for their unique property to effectively convert nitriles into corresponding carboxylic acids and ammonia. They can also form amides as by-products. In contrast to nitrile hydratases they do not require cofactors or prosthetic groups.

The research in this work is focused on nitrilase from filamentous fungus *Arthroderma benhamiae* and cyanide hydratase from *Aspergillus niger* K10. Genes of these enzymes were expressed using pET-30a(+) plasmid in the bacterium *Escherichia coli* strain BL21-Gold (DE3). The products obtained were purified by a series of ion exchange chromatography and gel filtration and subsequently characterized with respect to oligomeric state of the protein and its usability for protein crystallography.

To obtain information regarding the structural arrangement of the individual proteins, electrophoretic separation in polyacrylamide gel, gel filtration, analytical ultracentrifugation, mass spectrometry, dynamic light scattering and drop coating deposition Raman spectroscopy were used.

**Keywords:** nitrilase, cyanide hydratase, *Aspergillus niger*, *Arthroderma benhamiae*, liquid chromatography

(In Czech)

# Obsah

1. Úvod.....	11
1.1. Enzymy hydrolyzující nitrily .....	11
1.2. Nitrilasová superrodina .....	12
1.3. Nitrilasy.....	13
1.3.1. Struktura nitrilasových enzymů.....	14
1.4. Kyanidhydratasy .....	15
1.4.1. Struktura kyanidhydratas .....	16
1.5. Využití nitrilas a kyanidhydratas .....	16
1.6. <i>Aspergillus niger</i> .....	18
1.7. <i>Arthroderma benhamiae</i> .....	19
1.8. Studované enzymy .....	20
2. Cíl práce.....	21
3. Materiál.....	22
3.1. Bakteriální kmeny a buněčné linie .....	22
3.2. Chemikálie .....	22
3.3. Roztoky .....	23
3.6. Přístroje a pomůcky.....	25
4. Metody .....	27
4.1. Velkoobjemová příprava plasmidové DNA.....	27
4.1.1. Transformace kompetentních buněk .....	27
4.1.2. Kultivace bakteriálních kultur .....	27
4.1.3. Izolace plasmidové DNA .....	28
4.1.4. Horizontální agarosová elektroforéza.....	28
4.2. Produkce rekombinantní nitrilasy a kyanidhydratasy .....	29
4.2.1. Produkce v buňkách <i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3).....	29

4.2.2. Produkce v buňkách <i>Escherichia coli</i> SHuffle T7 Express.....	29
4.3. Purifikace proteinů .....	30
4.3.1. Příprava pelety před první chromatografií.....	30
4.3.2. Iontově výměnná chromatografie na koloně Q-Sepharose FF .....	30
4.3.3. Zakoncentrování proteinů.....	31
4.3.4. Gelová permeační chromatografie .....	31
4.3.5. Iontově výměnná chromatografie na koloně Source 15Q .....	32
4.3.6. Optimalizace skladování enzymů v redukované formě.....	32
4.4. Charakterizace připravených proteinů .....	32
4.4.1. Elektroforéza v prostředí SDS.....	32
4.4.2. Stanovení koncentrace proteinů .....	33
4.4.3. Stanovení enzymové aktivity .....	34
4.4.4. Sedimentační analýza .....	34
4.4.5. Hmotnostní spektrometrie pro stanovení disulfidických můstků .....	35
4.4.6. Dynamický rozptyl světla.....	35
4.4.7. Ramanova spektroskopie.....	35
4.5. Krystalizace proteinů .....	36
5. Výsledky .....	37
5.1. Příprava expresních vektorů.....	37
5.2. Rekombinantní exprese kyanidhydratasy a nitrilasy z <i>Aspergillus niger</i> a nitrilasy z <i>Arthroderma benhamiae</i> .....	38
5.3. Purifikace proteinů .....	39
5.3.1. Purifikace nitrilasy z <i>Arthroderma benhamiae</i> produkované v <i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3) .....	39
5.3.2. Purifikace kyanidhydratasy z <i>Aspergillus niger</i> .....	43
5.3.3. Purifikace nitrilasy z <i>Aspergillus niger</i> .....	45
5.3.4. Skladování redukované CNH s přidavkem různých roztoků .....	45

5.4. Produkce enzymů v expresním systému <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express .....	46
5.4.1. Hmotnostní spektrometrie .....	48
5.5. Charakterizace připravených proteinů .....	50
5.5.1. Specifická enzymová aktivita.....	50
5.5.2. Sedimentační analýza .....	50
5.5.3. Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků.....	52
5.5.3. Dynamický rozptyl světla.....	54
5.6. Krystalizace proteinů .....	56
6. Diskuse.....	58
7. Závěr .....	62
Seznam použité literatury a zdrojů .....	63



## Seznam použitých zkratk

AA	akrylamid
APS	peroxosíran amonný (ammonium persulfate)
BICIN	N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycin
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumine)
bp	pár bází, jednotka délky řetězce DNA (base pair)
β-ME	β-merkaptoethanol (neboli 2-merkaptoethanol)
CNH	kyanidhydratasa z <i>Aspergillus niger</i>
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
DCDR	Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povrchů (drop coating deposition Raman spectroscopy)
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)
FPLC	rychlá proteinová chromatografie (fast protein liquid chromatography)
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-pípeazinethansulfonová
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
IAA	indol-3-octová kyselina (indole-3-acetic acid)
IAN	indol-3-acetonitril
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
LB	název média dle Luria Bertaniho
LC-MS	hmotnostní spektrometrie spojená s kapalinovou chromatografií (liquid chromatography mass spectrometry)

MES	2-(N- <u>m</u> orfolino) <u>e</u> thansulfonová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie ( <u>m</u> ass <u>s</u> pectrometry)
NERED	<u>n</u> eredukující forma
NitAB	<u>N</u> itrilasa z <i><u>A</u>rrhroderma <u>b</u>enhamiae</i>
NitAN	<u>N</u> itrilasa z <i><u>A</u>spergillus <u>n</u>iger</i>
OD <sub>550</sub>	optická hustota při 550 nm ( <u>o</u> ptical <u>d</u> ensity)
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PBS	fosfátový pufr ( <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PEG	<u>p</u> olyethylenglykol
pI	isoelektrický bod
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid ( <u>p</u> henyl <u>m</u> ethylsulfonyl <u>f</u> luoride)
RED	<u>r</u> edukující forma
SDS	dodecylsulfát sodný ( <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí SDS
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin ( <u>t</u> ris-(2- <u>c</u> arboxy <u>e</u> thyl) <u>p</u> hospine)
TEMED	N,N,N',N'- <u>t</u> etramethylendi <u>a</u> min
TES	zkratka pro pufr obsahující Tris, EDTA, chlorid a azid sodný
TMAO	<u>t</u> rimethyl <u>a</u> min N- <u>o</u> xid
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	objemový zlomek ( <u>v</u> olume/ <u>v</u> olume)
w/v	hmotnostně-objemový zlomek ( <u>w</u> eight/ <u>v</u> olume)

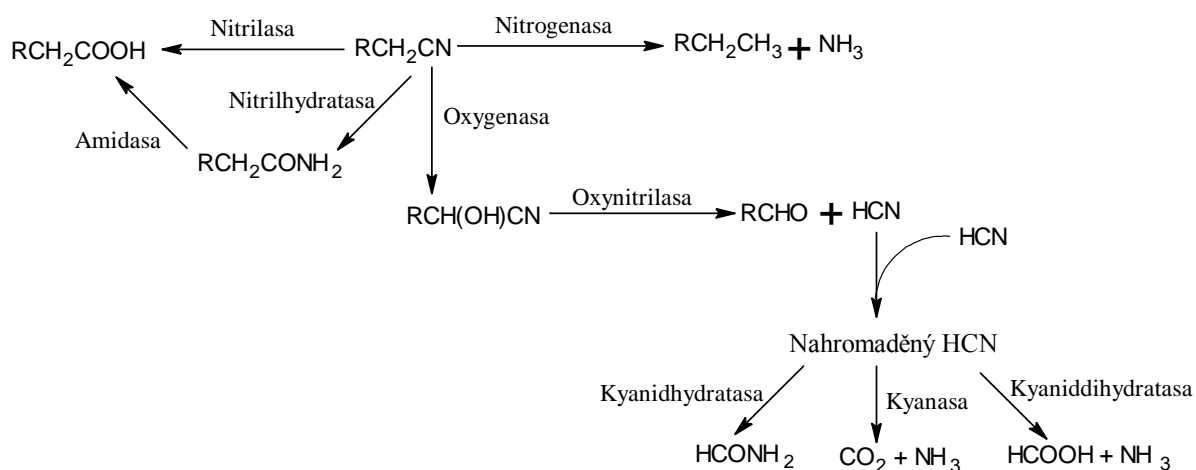
# 1. Úvod

## 1.1. Enzymy hydrolyzující nitrily

Nitrilové sloučeniny jsou všudypřítomné v životním prostředí. Přírodními producenty jsou rostliny, které vytváří například kyanolipidy, fenylacetonitril, alkaloid ricinin, kyanogenní glykosidy, jejichž hydrolýzou se uvolňuje jedovatý kyanovodík [1, 2]. Nebo jsou uvolňovány jako sekundární metabolity mikroorganismů, hub i vyšších živočichů [1]. Nezanedbatelný podíl mají i umělé nitrily a kyanidy vznikající činností člověka. Jsou jimi organická rozpouštědla, benzonitrilové herbicidy a pesticidy, meziprodukty v organické syntéze aminů, amidů, karboxylových kyselin, heterocyklických sloučenin atd. [2].

Přírodní i umělé nitrily a kyanidy mají neblahý vliv na většinu organismů. Vyšší expozice mohou vyvolat žaludeční problémy, respirační potíže, způsobit poruchy nervové soustavy. Řada látek vykazuje vysoce toxické, karcinogenní, mutagenní a teratogenní účinky.

Za vhodný způsob odstranění škodlivých látek obsahujících kyanidovou skupinu je považována biodegradace pomocí mikroorganismů [1-3]. Nitrily a kyanidy mohou být metabolizovány několika dráhami, viz schéma na obrázku č. 1.



Obr. 1: Metabolické dráhy odbourání nitrilů a kyanidů [2].

Odbourávání je umožněno hydrolytickými, oxidačními a redukčními reakcemi. Nitrilové sloučeniny mohou být zredukovány nitroenasami (systematickým názvem redukovaný ferredoxin:dinitrogenoxidoreduktasami) na uhlovodíky za uvolnění plynného amoniaku. Některé rostliny a hmyz degradují nitrily oxidační cestou, oxygenasami je převedou na  $\alpha$ -hydroxynitrily, které jsou dále odbourány na aldehydy nebo ketony oxynitrilasami (hydroxynitrillyasami). Nejvíce jsou zastoupeny hydrolytické reakce. Nitrilasy katalyzují hydrolýzu nitrilových sloučenin na příslušné karboxylové kyseliny a amoniak, nitrilhydratasy (NHasy) přeměňují nitrily na odpovídající amidy, které mohou být následně převedeny na karboxylové kyseliny pomocí amidas. Kyanovodík je metabolizán kyanidhydratasami, kyanidhydratasami nebo kyanasami. Kyanidhydratasy katalyzují hydrolýzu kyanovodíku na amidy, kyanidhydratasy na karboxylovou kyselinu a kyanasy na oxid uhličitý a amoniak.

Enzymy, které jsou schopné hydrolyzovat nitrilovou skupinu, na sebe přitahují stále větší pozornost ze strany vědců. Zájem pramení v jejich možném využívání jednak v biokatalýze při výrobě řady organických látek a léčiv a na druhé straně jako prostředku pro ošetření míst, které byly kontaminovány nitrilovými sloučeninami. V současné době je velká pozornost věnována nitrilasam. Protože o bakteriálních nitrilasach se ví mnohem více informací než o těchto enzymech ve vyšších organismech, rozhodla se naše laboratoř prozkoumat detailněji nitrilasy z vláknitých hub.

## 1.2. Nitrilasová superrodina

Nitrilasová superrodina je podle sekvenční podobnosti rozdělována do třinácti hlavních skupin enzymů: nitrilasy, alifatické amidasy, amino-terminální amidasy, biotinidasy,  $\beta$ -ureidopropionasy, karbamylasy, prokaryotní NAD synthetasy, eukaryotní NAD synthetasy, apolipoprotein N-acyltransferasy, Nit a NitFhit, NB11, NB12 a skupina nezařazených enzymů. Substrátová specifita je známa pouze u 9 skupin. Zvláštností je, že ačkoli je tato superrodina pojmenována jako nitrilasová, má ve skutečnost nitrilasovou aktivitu jen první skupina (nitrilasy), u ostatních se vyskytuje amidasová, amido-kondenzační, acyltransferasová nebo dosud neznámá aktivita [4].

Typickým znakem enzymů této superrodiny je, že obsahují v aktivním místě konzervovanou triádu aminokyselin Glu-Lys-Cys. Cysteinový zbytek slouží jako nukleofil, glutamátový vystupuje jako báze, která přijímá thiolový vodík z cysteinového zbytku

a lysinový zbytek elektrostaticky stabilizuje tetraedrální intermediát [4,5]. Dále tuto superrodinu proteinů charakterizuje  $\alpha\beta\alpha$ - $\alpha\beta\alpha$  uspořádání polypeptidových podjednotek [4,6,7]. Tyto vlastnosti byly předpovězeny z krystalových struktur DCasy (N-karbamyl-D-aminokyselina-amidohydrolasy) z bakterie *Agrobacterium sp.* KNK712 [5] a NitFhit z hlístice *Caenorhabditis elegans* [8].

Enzymy nitrilasové superrodiny slouží k různým důležitým biologickým pochodům, například k syntéze signálních molekul, hrají roli v metabolismu koenzymů a vitaminů, u posttranslačních modifikací proteinů, v detoxikaci látek apod. [6].

### 1.3. Nitrilasy

Nitrilasy (EC 3.5.5.1, systematickým názvem nitrilaminohydrolasy) jsou dnes poměrně dobře charakterizovanou skupinou enzymů, jež katalyzuje hydrolýzu nepeptidových vazeb mezi atomem uhlíku a dusíku. Společně s kyanidhydratasami a kyanidhydratasami jsou nitrilasy řazeny do první skupiny nitrilasové superrodiny [4].

Historie nitrilas je spojována s rostlinným růstovým hormonem indol-3-octovou kyselinou. Takto první popsáný enzym byl izolován z listů ječmene a díky své schopnosti přeměňovat indol-3-acetonitril (IAN) na indol-3-octovou kyselinu (IAA) byl pojmenován jako indolacetonitrilasa [9]. Později byl však přejmenován na nitrilas, když se ukázalo, že přijímá mnoho jiných nitrilů za své substráty a hydrolyzuje je s vyšší rychlostí než indolacetonitril [10]. První objevený bakteriální enzym byl izolován z půdní bakterie rodu *Pseudomonas*, která hydrolyzuje ricinin (3-kyano-4-methoxy-N-methyl-2-pyridon) [11]. Nejranější studie nitrilasové aktivity u vláknitých hub se týkaly rodů *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* a *Gibberella*, které dokáží hydrolyzovat IAN na IAA [10]. Od 70. let 19. století bylo vydáno mnoho publikací vztahujícím se k bakteriálním, fungálním, rostlinným a živočišným nitrilasům. V posledních několika letech je asi největší pozornost věnována nitrilasům z vláknitých hub [4,12]. V řadě výzkumů už nejde jen o nativní producenty nitrilas nýbrž o rekombinantně připravené enzymy, jako příklad lze uvést několik fungálních nitrilas z *Aspergillus niger*, *Gibberella moniliformis*, *Neurospora crassa*, *Penicillium marneffe* [13,14], *Arthroderma benhamiae* a *Nectria haematococca* [15], které byly exprimovány v *Escherichia coli*. Bakterie *E. coli* je nejužívanějším a nejprozkoumanějším organismem, který je využíván pro rekombinantní expresi

proteinů, neboť je výhodný z mnoha různých důvodů, především díky své odolnosti, rychlému růstu kultury, časové a finanční nenáročnosti.

Podle substrátové specifity jsou nitrilasy často rozdělovány do tří podtříd (skupin): na aromatické a heterocyklické, alifatické a arylalifatické nitrilasy (arylacetonitrilasy) [1]. Ovšem některé enzymy nelze jednoznačně přiřadit do žádné skupiny, protože přeměňují širokou škálu nitrilů. Například nitrilasa z *Bacillus pallidus* Dac521 hydrolyzuje aromatické, alifatické a heterocyklické nitrily [16], enzymy z *Aspergillus niger* K10 také přeměňují mnoho nitrilů [17]. Naproti tomu existují nitrilasy, jenž jsou velmi specifické pro jeden konkrétní substrát. Takovým příkladem je nitrilasa z *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*, která vykazuje vysokou specifitu pro hydrolýzu herbicidu bromoxynilu [18].

### 1.3.1. Struktura nitrilasových enzymů

Nejčastěji jsou nitrilasy složeny z jednoho typu podjednotky, která se u jednotlivých organismů liší svou velikostí. Obvykle se její molekulová hmotnost pohybuje kolem 40 kDa, O'Reilly a Turner ve své práci popisují rozmezí 32 až 45 kDa. Podjednotky mají schopnost se spojovat za účelem tvorby aktivní formy enzymu [1,19]. Například nitrilasa z *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11215 je aktivní v komplexu, složeném z 12 podjednotek [1], zatímco nitrilasa z *Rhodococcus rhodochrous* PA-34 je aktivní i jako monomer [20]. Enzym z vláknité houby *Fusarium solani* se vyskytuje jako oktamer a je výjimečný velikostí podjednotky, která činí 76 kDa [21].

Některé enzymy agregují až v důsledku aktivace substrátem. Poprvé byl tento jev pozorován u nitrilasy z *Nocardia* sp. NCIB 11216. Když je enzym purifikován bez přítomnosti benzonitrilu, vykazuje velikost 47 kDa, v jeho přítomnosti má molekulovou hmotnost 560 kDa. V takovém případě hovoříme o inducibilním enzymu [2,19].

Existují i heterogenní nitrilasy, které jsou tvořeny dvěma různými podjednotkami. Nitrilasové proteiny se mohou spojovat s jinými proteiny – chaperony („heat shock proteins“, Hsps). O těchto proteinech je známo, že pomáhají bílkovinám nalézt prostorové uspořádání odpovídající nativní konformaci, zabránit jejich předčasnému svinutí a zamezit intermolekulárním interakcím ještě nesložených bílkovin a tím jejich degradaci. Většinou se chaperony váží na hydrofobní část polypeptidu a tato oblast je pak ukryta uvnitř

proteinu v jeho konečné trojrozměrné struktuře. Takovéto spojení bylo nalezeno u nitrilasy z bakterie *Pseudomonas fluorescens* DSM 7155 s proteinem Cpn60 [22] a u nitrilasy z *Bacillus pallidus* Dac521 s proteinem GroEL [16]. V současné době je zkoumáno spojení chaperonů i s jinými nitrilasami (*Aspergillus niger* K10, *Neurospora crassa*, *Penicillium marneffei*, *Gibberella moliniformis*) [14, 23] ve snaze pochopit význam tohoto uskupení.

Jak je vidět z výše uvedených odstavců, nitrilasy se ve své struktuře značně odlišují. Proto je třeba ke každému izolovanému nebo připravenému enzymu v tomto směru přistupovat zcela individuálně.

#### 1.4. Kyanidhydratasy

Kyanidhydratasy (EC 4.2.1.66, systematickým názvem formamidhydrolyasy) jsou společně s kyanidhydratasami řazeny k nitrilasám do první skupiny nitrilasové superrodiny, ačkoliv jsou to ve skutečnosti lyasy z hlediska čtyřčíselného klasifikačního systému enzymů zavedeného Mezinárodní biochemickou a molekulárně biologickou společností (IUBMB – International Union of Biochemistry & Molecular Biology). Přidružení kyanidhydratas k nitrilasám je dáno jejich relativní podobností v aminokyselinové sekvenci a celkové proteinové struktuře. Protože je často obtížné předpovědět u domnělých enzymů z jejich aminokyselinové sekvence příslušnost k nitrilasám nebo kyanidhydratasám, jsou často označovány jako kyanidhydratasy/nitrilasy [12]. Tyto dvě skupiny ale nemají jen společné znaky. Liší se ve svých katalytických vlastnostech a tím je lze od sebe oddělit. Zatímco nitrilasy přijímají jako substráty organické nitrily a jejich substrátová specifita je často poměrně široká, kyanidhydratasy mají vysokou specifitu pouze ke kyanovodíku, který převádí na formamid [4,12,19].

První záznam o kyanidhydratase se objevil roku 1972 v článku o přeměně kyanidu na formamid pomocí enzymu z houby *Stemphylium loti*, kdy Fry a Millar upozornili na podobnost tohoto enzymu s nitrilasou z ječmene a ricinovou nitrilasou [24]. Od té doby bylo identifikováno mnoho kyanidhydratas z různých druhů hub, ale v bakteriích ani rostlinách nalezeny nebyly [19]. Z novějších studií lze uvést práci zaměřenou na rekombinantně připravené kyanidhydratasy z *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Gibberella zeae* a *Gloeocercospora sorghi* [25] a dále *Aspergillus niger* K10 [26]. Nalezeny byly i enzymy s dvojí aktivitou, např. kyanidhydratasy z *Aspergillus niger* K10

a *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255, které kromě vysoké specifické aktivity ke kyanovodíku vykazují i aktivitu k 2-kyanopyridinu [12].

#### 1.4.1. Struktura kyanidhydratas

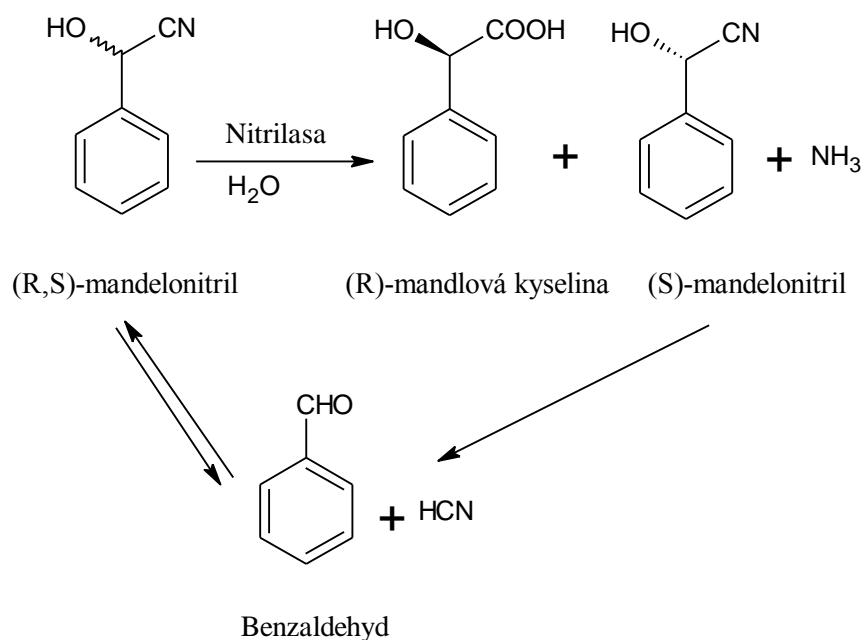
Všechny doposud analyzované kyanidhydratas vykazují navzájem mezi sebou mnohem větší podobnost než výše zmíněné nitrilasy. Molekulová hmotnost podjednotky těchto enzymů je přibližně 40 kDa. Odlišnosti jsou ve velikostech komplexů v nativním (přirozeném) stavu. Většina enzymů má molekulovou hmotnost větší než 300 kDa, například zkoumané kyanidhydratasy z *Fusarium solani*, *Fusarium laterium* a *Gleocercospora sorghi*. Výjimkou je patogenní houba *Leptosphaeria maculans* s velikostí jen 160 kDa [19].

#### 1.5. Využití nitrilas a kyanidhydratas

Důvodů proč usilovat o využívání enzymových systémů existuje hned několik. Velkou výhodou reakcí katalyzovaných nitrilasami je, že běží za mnohem mírnějších podmínek, konkrétně v neutrálním pH a při laboratorní teplotě, než klasické chemické hydrolýzy, které vyžadují přítomnost silných zásad či kyselin. Navíc reakce, v nichž jsou zapojeny nitrilasy, probíhají často zcela bez vzniku vedlejších produktů nebo jen v jejich minimálním zastoupení, čehož v organické syntéze lze jen těžko dosáhnout [2].

Další předností těchto enzymů je schopnost převádět racemickou směs chirálních látek na jeden konkrétní enantiomer. Protože i když mají jednotlivé enantiomery stejné fyzikální vlastnosti kromě optických, liší se obvykle vlastnostmi biologickými. Tato vlastnost je důležitá zejména ve farmaceutickém průmyslu, neboť velice často jeden enantiomer dané látky má léčivé účinky a druhý nikoli. Příkladem je všem dobře známý ibuprofen, jehož S-enantiomer vykazuje protizánětlivé a analgetické účinky, kdežto enantiomer R je neúčinný. I když R-forma nemá výrazný neblahý účinek, významně snižuje rychlost, s jakou se dostaví účinek (S)-ibuprofenu [27]. V této souvislosti byl studován vliv *Acinetobacter* sp. AK226 na racemickou směs 2-(4'-isobutylfenyl)propionitrilu [28]. Enantioselektivity je využíváno i při výrobě kyseliny (R)-mandlové z (R,S)-mandelonitrilu (Obr. 2, str. 15). Vysokého výtěžku kyseliny mandlové lze dosáhnout použitím nitrilasy z gramnegativní bakterie *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 [29].





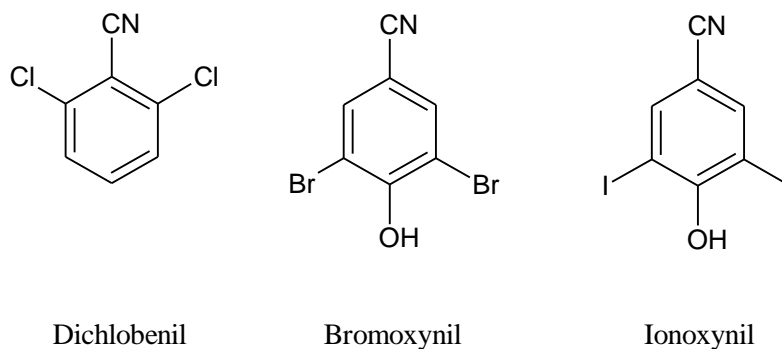
Obr. 2: Produkce (R)-mandlové kyseliny pomocí nitrilasy [9].

Mezi další významné látky, které je možné získat pomocí nitrilasy a kyanidhydratas, patří kyselina nikotinová (známá jako niacin nebo vitamin B3), nikotinamid, kyselina glykolová (2-hydroxyethanová), akrylamid a kyselina akrylová (2-propenová) [2,3]. Farmaceuticky významná kyselina nikotinová stejně jako nikotinamid jsou získávány z 3-kyanopyridinu za účasti *Rhodococcus rhodochrous* J1 [30]. Glykolová kyselina je za pomoci nitrilasových enzymů produkována z glykolnitrilu. Našla uplatnění jako součást přípravků o pleť v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, jako aromatická přísada a konzervační látka v potravinářském odvětví, atd. Z akrylonitrilu produkovaná kyselina akrylová se hojně využívá stejně jako akrylamid v papírenském, textilním a stavebním průmyslu.

Tyto enzymy jsou velkou nadějí pro bioremediaci míst kontaminovaných nitrilovými sloučeninami. Pesticidy a herbicidy používané k hubení nežádoucích škůdců tvoří velkou skupinu chemických látek, jež se dostává do životního prostředí a zatěžuje ho. Mezi takové látky patří dichlobenil (2,6-dichlorbenzonitril), bromoxynil (3,5-dibrom-4-hydroxybenzonitril) a ionoxynil (4-hydroxy-3,5-dijodbenzonitril) (Obr. 3, str. 18). Metabolity herbicidů často vykazují zvýšenou rozpustnost ve vodě, čím snadněji přechází do vody a půdy a představují zvýšené riziko pro lidi a zvířata žijící v blízkém okolí. Nežádoucími sloučeninami znečišťujícími životní prostředí jsou i některá

průmyslově využívaná organická rozpouštědla (akrylonitril, benzonitril, acetonitril, apod.) [1-3].

Významnou rolí enzymů je i detoxikace. Pokud organismy, žijící v místech, kde je voda nebo půda kontaminována nitrilovými sloučeninami, obsahují nitrilasu, kyanidhydratasu, případně kyaniddihdratasu, mají zvýšenou toleranci vůči kyanidu a nitrilům. To znamená, že snesou větší koncentraci dusíkatých škodlivin než organismy, které tyto enzymy nemají. Příkladem je vláknitá houba *Fusarium solani*, která díky kyanidhydratase dokáže hydrolyzovat toxické kyanidy. Navíc je organismus často schopen hydrolýzou získat dusík pro posílení svého růstu a prosperity [1].



Obr. 3: Chemické struktury herbicidů.

### 1.6. *Aspergillus niger*

Organismus *Aspergillus niger* je řazen k haploidním vláknitým houbám (druh *Aspergillus niger*, rod *Aspergillus*, řád *Eurotiales*, třída *Eurotiomycetes*, kmen *Ascomycota*, podříše *Dikarya*, říše Houby) [31]. Své druhové označení *niger* získal podle tmavě až černě zbarvených konidiálních hlaviček, které se postupně objevují na původním bílém myceliu [32]. *Aspergillus* se rozmnožuje nepohlavně pomocí konidií, teleomorfa u něj dosud není známa [33].

Rod *Aspergillus* je všudypřítomný v životním prostředí, *Aspergillus niger* můžeme běžně nalézt v půdě, na rozkládajícím se rostlinném materiálu, uskladněných potravinách rostlinného i živočišného původu. Tato saprofytická houba dobře snáší široké rozmezí teplot 6 – 47 °C, nevadí jí sucho [32-34].

Velikost genomu *A. niger* se odhaduje na 35,5 až 38,5 Mb [35], například *Aspergillus niger* CBS 513.88 má velikost 33,9 Mb [36]. Genom se rozděluje do více částí, osmi lineárních chromozomů, o různých velikostech (3,5 – 6,6 Mb) [35].

*A. niger* je hojně využíván v potravinářském průmyslu při výrobě enzymů (amylasy, lipasy, celulasy, proteasy, pektinasy, fytasy, atd.) a organických kyselin (především kyseliny citronové a glukonové). Produkce kyseliny citronové pomocí *A. niger* je v současné době nejúčinnější metodou, poskytuje nejvyšší výnosy ze všech doposud užitých biologických procesů v průmyslovém odvětví [35]. Kyselina citronová je uplatňována v mnoha odvětvích. Primárně slouží v potravinářství k okyselování potravin a nápojů, jako jsou džemy, sladkosti, různé dezerty, ovocné šťávy, vína, apod. Dále je využívána ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu jako antioxidant a pufr pro úpravu pH, v lékařství ke konzervaci krevních vzorků. Dokonce našla uplatnění i v elektrolytických aplikacích. Řada produktů z tohoto organismu obdržela statut všeobecně bezpečného výrobku GRAS (Generally Recognised As Safe) od Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) USA [34].

I když je *A. niger* ve vztahu k lidskému zdraví považován za bezpečný organismus, může vyvolat u některých jedinců ušní a plicní infekce a to především u osob s oslabeným imunitním systémem. Specifické kmeny tohoto organismu mohou vyvolat produkci mykotoxinů, sekundárních metabolitů, které mohou kontaminovat široké spektrum potravin a krmiv [34, 37]. Mezi mykotoxiny produkované *A. niger* patří kyselina šťavelová, nafto-4-pyrony a cyklické pentapeptidy zvané malforminy [37].

### **1.7. *Arthroderma benhamiae***

*Arthroderma benhamiae* neboli *Trichophyton mentagrophytes* je tentýž organismus, patřící mezi vláknité houby (druh *Arthroderma benhamiae*, rod *Arthroderma*, řád *Onygenales*, třída *Eurotiomycetes*, kmen *Ascomycota*, podříše *Dikarya*, říše Houby) [38]. Přičemž první označení *Arthroderma benhamiae* se vztahuje ke stádiu houby, ve kterém dochází k pohlavnímu rozmnožování (teleomorfní forma, tj. perfektní, rozplazovací forma, spojená se střídáním jaderných fází s následnou meiózou). A druhé pojmenování *Trichophyton mentagrophytes* vyjadřuje stádium nepohlavního způsobu rozmnožování (anamorfa neboli imperfektní, vedlejší rozmnožovací forma, konidiové stádium) [39]. Délka genomu *A. benhamiae* (GenBank: ABSU000000000) činí 22,3 Mb [40].

*Arthroderma benhamiae* je řazena mezi zoofilní dermatofyty, kožní parazity způsobující mykózy u lidí a zvířat. První výskyt dermatofytózy byl hlášen ve Švýcarsku. Za nejpravděpodobnějšího původce infekce jsou považováni malí hlodavci (morčata, křečci, zakrslí králíci, myši, krysy) [41]. Nejčastěji *Arthroderma* napadá kůži, vlasy a nehty. U člověka způsobuje povrchové infekce (mykózy nohou, pásový opar) a vyvolává závažné zánětlivé reakce. Tyto infekce jsou často doprovázené svěděním a olupováním postižených oblastí [40].

*A. benhamiae*, keratofilní houba využívá jako jediný zdroj uhlíku a dusíku pevný nerozpustný keratin, který rozkládá pomocí kyselých proteas na oligopeptidy a aminokyseliny [40,42].

### 1.8. Studované enzymy

Tato práce se zabývá především dvěma enzymy: nitrilasou z vláknité houby *Arthroderma benhamiae* CBS 112371 (GenBank: EFE30690) a kyanidhydratasou z organismu *Aspergillus niger* kmene K10 (CCF 3411, GenBank: ABX75546). Tato kyanidhydratasa byla dříve mylně považována za nitrilasou [23,43]. Geny pro oba tyto proteiny byly zaklonovány v plasmidu pET-30a(+). V obou případech byla primárně využita heterologní exprese v bakteriích *Escherichia coli* kmene BL21-Gold (DE3). Obecně všechny plasmidy pET-systému obsahují silný T7 promotor, který je specifický pouze pro T7 RNA polymerasu z bakteriofága T7. Gen pro T7 RNA polymerasu je vnesen do genomu bakterie pomocí bakteriofága T7 jako profág DE3 (odtud označení v názvu bakterií) a nachází se pod kontrolou *lacUV5* promotoru, který je za nepřítomnosti induktoru inhibován *lac* represorem. Jakmile je přidán induktor, například laktosa nebo isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), represor je odstraněn a začne probíhat exprese, pomocí RNA polymerasy *E. coli* dochází k přepisu genu pro T7 RNA polymerasu a následně dochází k translaci. Vzniklá T7 RNA polymerasa nasedá na T7 promotor příslušného plasmidu a přepisuje gen pro cílový protein. Výhodnější je použít k indukci IPTG, protože nepodléhá enzymovému odbourání a jeho koncentrace se tak z media nesnižuje [44,45].

Během mého studia bylo provedeno i několik pokusů s nitrilasou z vláknité houby *Aspergillus niger* K10. Gen pro tuto nitrilasou byl zaklonován v plasmidu pET-22b(+).

## 2. Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo rekombinantní expresí připravit kyanidhydratasu z organismu *Aspergillus niger* K10 a nitrilasu z *Arthroderma benhamiae* CBS 112371. Následně optimalizovat jejich purifikaci pomocí kapalinové vysokoúčinné chromatografie v redukujícím i oxidativním prostředí a takto připravené enzymy charakterizovat. Dalším bodem práce bylo pokusit se o krystalizaci těchto proteinů.

Dílčím úkolem bylo zkusit produkovat nitrilasu z *Arthrodermy benhamiae* a nitrilasu s kyanidhydratasou z *Aspergillus niger* v bakteriálním kmeni *E. coli* SHuffle T7 Express.

### 3. Materiál

#### 3.1. Bakteriální kmeny a buněčné linie

<i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3)	<i>Stratagene</i> , USA
<i>E. coli</i> DH5α	RNDr. Marek Ingr, Ph.D., PřF UK Praha, ČR
<i>E. coli</i> SHuffle T7 Express	<i>New England Biolabs</i> , USA
pET22b(+)_NitAN	MSc. Ondřej Kaplan, Ph.D., MBÚ AVČR
pET30a(+)_CNH	MSc. Ondřej Kaplan, Ph.D., MBÚ AVČR
pET30a(+)_NitAB	MSc. Ondřej Kaplan, Ph.D., MBÚ AVČR

#### 3.2. Chemikálie

Agar	<i>Oxoid</i> , Anglie
Agarosa	<i>Sigma</i> , USA
Akrylamid	<i>Sigma</i> , USA
Ampicilin	<i>Biotika</i> , Slovensko
APS	<i>Serva</i> , USA
Azid sodný	<i>Serva</i> , USA
BSA	<i>New England Biolabs</i> , USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Serva</i> , USA
Cystamin dihydrochlorid	<i>Sigma</i> , USA
Cysteamin hydrochlorid	<i>Sigma</i> , USA
Činidlo dle Bradfordové	<i>Bio-Rad</i> , Německo
DTT	<i>Serva</i> , USA
EDTA	<i>Jersey Lab Supply</i> , USA
Glycerol	<i>Lach-Ner</i> , ČR
Glycin	<i>Fluka</i> , Švýcarsko
GoodView	<i>Ecoli</i> , Slovensko
HEPES	<i>Sigma</i> , USA
Chlorid sodný	<i>Lach-Ner</i> , ČR
IPTG	<i>Serva</i> , USA
JCSG+ Suite	<i>Qiagen</i> , USA
JCSG Core I-IV Suites	<i>Qiagen</i> , USA

Kanamycin	<i>Imuna Pharm, ČR</i>
Kvasničný extrakt	<i>Serva, USA</i>
Leupeptin	<i>Sigma, USA</i>
Lysozym	<i>Sigma, USA</i>
2-merkaptoethanol	<i>Sigma, USA</i>
Oxidovaný glutathion (GSSG)	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
PMSF	<i>Serva, USA</i>
RNasa A	<i>Serva, USA</i>
Redukovaný glutathion (GSH)	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
Sacharosa	<i>Lach-Ner, ČR</i>
SDS	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Standard pro agarosovou elektroforézu	<i>New England Biolabs, USA</i>
Standard pro SDS-PAGE (barevný)	<i>Bio-Rad, Německo</i>
Standard pro SDS-PAGE (modrý)	<i>Amersham Bioscience, Švédsko</i>
TCEP-HCl	<i>Sigma, USA</i>
TEMED	<i>Serva, USA</i>
Tris	<i>Roth, USA</i>
Trypton	<i>Oxoid, Anglie</i>

### 3.3. Roztoky

- **LB agar:** 1,5 % agar v LB médiu
- **LB médium:** 1 % trypton; 0,5 % kvasničný extrakt; 1 % NaCl; pH = 7,4
- **Pufry pro izolaci plasmidů:**
  - ✓ **E4:** 100 mM Tris; 1,25 M NaCl; pH = 8,5
  - ✓ **EQ1:** 0,1 M CH<sub>3</sub>COONa; 0,6 M NaCl; 0,15 % (v/v) TRITON X100; pH = 5,0
  - ✓ **LYS:** 0,2 M NaCl; 0,1 % (w/v) SDS
  - ✓ **N3:** 3,1 M CH<sub>3</sub>COOK; pH = 5,5
  - ✓ **RES:** 50 mM Tris; 10 mM EDTA; 0,1 mg/ml RNasa A
  - ✓ **WASH:** 0,1 mM CH<sub>3</sub>COONa; 0,825 M NaCl; pH = 5,0
- **Pufry pro SDS-PAGE:**
  - ✓ **AA:** 30 % akrylamid, 1 % N,N'-methylen-bis-akrylamid

- ✓ **Barvicí roztok pro SDS-PAGE:** 45 % methanol; 10 % kyselina octová; 0,25 % CBB R-250
- ✓ **Elektrodový pufr pro SDS-PAGE:** 10 × koncentrovaný: 3 % Tris; 14,4 % glycín; 1 % SDS; pH = 8,3
- ✓ **Odbarvovací roztok pro SDS elektroforézu:** 35 % ethanol; 10 % kyselina octová
- ✓ **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující:** 2 × koncentrovaný: 100 mM Tris; 20 % glycerol; 4 % SDS; 0,2 % bromfenolová modř; pH = 6,8
- ✓ **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující:** 2 × koncentrovaný: 100 mM Tris; 20 % glycerol; 4 % SDS; 0,2 % bromfenolová modř; 100 mM DTT; pH = 6,8
- **Pufr pro gelovou chromatografií:**
  - ✓ **HEPES:** 10 mM HEPES; 150 mM NaCl; 10 mM NaN<sub>3</sub>; 10 mM β-ME; pH = 7,5
  - ✓ **Tris:** 20 mM Tris; 150 mM NaCl; 10 mM NaN<sub>3</sub>; 10 mM β-ME; pH = 8,5
- **Pufry pro ionexovou chromatografií na Q-Sepharose:**
  - ✓ **Pufr A:** 50 mM Tris; 150 mM NaCl; 10 mM NaN<sub>3</sub>; 10 mM β-ME; pH = 6,5<sub>pro</sub> CNH/8,0<sub>pro</sub> NitAB
  - ✓ **Pufr B:** 25 mM Tris; 500 mM NaCl; 10 mM NaN<sub>3</sub>; 10 mM β-ME; pH = 6,5<sub>pro</sub> CNH/8,0<sub>pro</sub> NitAB
- **Pufry pro ionexovou chromatografií na koloně Source™ 15Q:**
  - ✓ **Pufr C:** 20 mM BisTris; 10 mM NaN<sub>3</sub>; 10 mM β-ME; pH = 7,0
  - ✓ **Pufr D:** 20 mM BisTris; 500 mM NaCl; 10 mM NaN<sub>3</sub>; 10 mM β-ME; pH = 7,0
- **TAE pufr pro agarosovou elektroforézu:** (1× koncentrovaný) 40 mM Tris, 20 mM CH<sub>3</sub>COOH; 1 mM EDTA; pH = 8,3
- **TES pufr:** 10 mM Tris; 2 mM EDTA; 150 mM NaCl; 10 mM NaN<sub>3</sub>; pH = 8,0



### 3.6. Přístroje a pomůcky

Analytická ultracentrifuga Proteomelab XL-I	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Analytické váhy	<i>AND, USA</i>
Autokláv Varioklav 300/400/500 EP-Z	<i>H+P Labortechnik GmbH, Německo</i>
Automatické pipety Discovery	<i>HTL, Polsko</i>
Automatické pipety Pipetman	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga Allegra™ X-22	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga EBA 12 R	<i>Hettich, Německo</i>
Centrifuga 5415 R (Eppendorf)	<i>LAB MARK, ČR</i>
Centrifugační filtry Ultrafree®-MC	<i>Millipore, USA</i>
Centrifugační zkumavky Oak Ridge	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Čtečka mikrotitračních destiček Sunrise	<i>Tecan, USA</i>
Destička SpectRIM™	<i>Tienta Sciences, Francie</i>
Filtry pro sterilizaci PES 0,22 µm	<i>BioTech, ČR</i>
Filtry s póry 0,025 µm	<i>Millipore, USA</i>
FPLC systém ÄKTA prime plus	<i>Amersham Bioscience, Švédsko</i>
Fotoaparát Cyber-shot DSC-W570	<i>SONY, Japonsko</i>
HPLC systém ÄKTA basic	<i>Amersham Bioscience, Švédsko</i>
Inkubátor IR 1500 Automatic CO <sub>2</sub>	<i>LABsystem, ČR</i>
Kahan	<i>závod Votice, ČR</i>
Kolona Source™ 15Q 4.6/100 PE	<i>Amersham Bioscience, Švédsko</i>
Kolona Superdex™ 200 10/300 GL	<i>Amersham Bioscience, Švédsko</i>
Kolona Q-Sepharose™ Fast Flow	<i>GE Healthcare, USA</i>
Koncentrátory Amicon Ultra	<i>Millipore, USA</i>
Krystalizační destičky Intelli-plate 96	<i>Art Robbin Instruments, USA</i>
Krystalizační robot Crystal Gryphon	<i>Art Robbin Instruments, USA</i>
Křemenné kyvety 3×3 mm	<i>Hellma Analytics, Německo</i>
Laminární box Clean Air Techniek B.V.	<i>PMV, Nizozemí</i>
Magnetická míchačka MM A2	<i>Lab.přístroje Praha, ČR</i>
Mikrocentrifuga MiniStar Silverline	<i>VWR, USA</i>
Mikrospektrometr LabRAM HR 800	<i>Horiba Jobin Yvon, Francie</i>
Mikrostříkačka	<i>Hamilton, USA</i>
Mrazicí box (-20 °C)	<i>Calex, ČR</i>

Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	Sanyo, Japonsko
pH-metr 3310	<i>Jenway</i> , UK
Pure Link™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit	<i>Invitrogen</i> , USA
Předvážky KB 1200-2	<i>Kern</i> , Německo
Rotační vakuová odparka SpeedVac	<i>Savant</i> , USA
Souprava pro agarosovou elektroforézu	<i>Biokeystone</i> , USA
Souprava pro SDS-PAGE	<i>Bio-Rad</i> , Německo
Třepačka G24 Environmental Incubator Shaker	<i>Toronto Surplus</i> , USA
Třepačka ORBI-SAFE TS NetWise	<i>Gallenkamp</i> , Německo
Ultrazvuková sonda Sonopuls SH 70G	<i>Bandelin</i> , Německo
UV prosvěcovací lampa	<i>UVITEC</i> , USA
UV/VIS spektrometr UV4 Series	<i>UNICAM</i> , UK
Vaříč	<i>ETA</i> , ČR
Vodní lázeň TW2	<i>Julabo</i> , Německo
Vortexový mixér	<i>VELP Scientifica</i> , Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	<i>Milipore</i> , USA
Zdroj napětí PS 251-2	<i>Sigma-Aldrich</i> , USA
Zetasizer Nano ZS	<i>Malvern Instruments Ltd.</i> , Velká Británie

## 4. Metody

### 4.1. Velkoobjemová příprava plasmidové DNA

#### 4.1.1. Transformace kompetentních buněk

Transformace kompetentních buněk se provádí metodou tepelného šoku, buňky se po přidání plasmidu uchovávají na ledu a pak se na krátkou dobu vystaví tepelnému šoku, přičemž přijmou námi vložený plasmid.

Kompetentní buňky *E. coli* kmene DH5 $\alpha$  byly vyjmuty z mrazícího boxu (-80 °C) a ponechány rozmraznout v ledové lázni. Alikvot o objemu 200  $\mu$ l byl rozdělen na dvě části a ke každé byl přidán 1  $\mu$ l příslušného plasmidu. Vzniklá směs byla inkubována 30 min na ledu, pak byla vložena přesně na 1 min do vodní lázně předehřáté na 42 °C, poté zpět na led. Dále byl přidán 1 ml LB média předehřátého na 37 °C, směs byla v mikrozkušavkách promíchána a umístěna na 1 hod do inkubátoru vyhřátého na 37 °C. Poté byla suspenze odstředěna, většina supernatantu byla odstraněna, ve zbytku (cca 100  $\mu$ l) byla peleta resuspendována a vyseta na agarovou plotnu s příslušnými antibiotiky (pET-30a(+)) s kanamycinem o výsledné koncentraci 50  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> a pET-22b(+)) s ampicilinem o výsledné koncentraci 100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>). Plotny, obrácené dnem vzhůru, byly ponechány 16 hod v inkubátoru při 37 °C.

#### 4.1.2. Kultivace bakteriálních kultur

Druhý den bylo na každou misku s koloniemi naneseno přibližně 5 ml LB média, v němž byly bakterie resuspendovány a převedeny v laminární boxu do sterilních 2 l Erlenmeyerových baněk s 500 ml LB média a příslušným antibiotikem. Následně byly kultury třepány na orbitální třepačce rychlostí 220 ot.min<sup>-1</sup> po dobu 14 hod při 37 °C.

Pak byl obsah baněk centrifugován v 250 ml kyvetách 30 min při 4500  $\times$  g a 20 °C a supernatant byl odstraněn. Poté byly pelety resuspendovány ve 20 ml TES pufru, převedeny do 50 ml zkumavek s víčky a směs byla centrifugována 15 min při 4500  $\times$  g. Supernatant byl odstraněn a pelety byly hned zpracovány anebo uchovávány při -20 °C.

#### 4.1.3. Izolace plasmidové DNA

Pro izolaci plasmidové DNA byla využita komerčně dostupná souprava PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit [46], přičemž kolony dodávané s tímto komerčním kitem byly běžně recyklovány pro opakované použití a všechny potřebné roztoky byly standardně připravovány podle složení deklarovaného výrobcem (viz 3.3.) a před použitím zfiltrovány.

Bakteriální pelety v 50 ml zkumavce byly důkladně resuspendovány v 18 ml RES pufru s přidanou RNAasou. Suspenze byla rozdělena do dvou 30 ml centrifugačních zkumavek typu Oak ridge, do každé kyvety bylo přidáno 9 ml LYS pufru, směs byla citlivě, ale důkladně promíchána a inkubována 5 min při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 9 ml N3 pufru, směs byla promíchána a centrifugována 10 min při  $20000 \times g$  a teplotě  $20^{\circ}\text{C}$ . Mezitím byly připraveny kolony uchovávané v 20% EtOH, nejprve byly promyty dostatečným množstvím  $\text{dH}_2\text{O}$  a následně ekvilibrovány  $2 \times 25$  ml EQ1 pufru. Po centrifugaci byl supernatant aplikován na kolonu přes filtrační papír a centrifuga se nechala předchladit na  $0^{\circ}\text{C}$ . Po prokapání filtrátu, byl filtrační papír odstraněn a kolona byla promyta 25 ml Wash roztoku. Následně byla eluována DNA 15 ml E4 pufru do 30 ml centrifugačních zkumavek typu Oak ridge. K eluátu bylo přidáno 10,5 ml předchlazeného isopropanolu ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) a směs byla centrifugována 30 min při  $16000 \times g$  a  $0^{\circ}\text{C}$ . Mezitím byly recyklovány kolony (promyty 1M HCl, následně  $\text{dH}_2\text{O}$  a nakonec EtOH pro UV spektroskopii a skladovány v lednici při  $4^{\circ}\text{C}$ ). Po centrifugaci byl supernatant odstraněn, pelety opláchnuty 5 ml 70% předchlazeného EtOH ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Následovala centrifugace 10 min při  $16000 \times g$  při  $0^{\circ}\text{C}$ . Supernatant byl opět odstraněn a pelety byly vysušeny ve vakuové rotační odparce (SpeedVac) a pak rozpustěny v 1 ml sterilní  $\text{dH}_2\text{O}$  a roztok přenesen do mikrozkuhavky.

Koncentrace a čistota získaných plasmidů byla stanovena spektrofotometricky. Vzorky byly při stanovení  $300 \times$  zředěny  $\text{dH}_2\text{O}$ , absorbance byla měřena při vlnové délce 260 a 280 nm a finální výpočet byl proveden pomocí webové aplikace *Nucleic Acids Calculator* [47]. Nakonec byla ještě provedena kontrola čistoty a celistvosti plasmidů pomocí agarosové elektroforézy.

#### 4.1.4. Horizontální agarosová elektroforéza

V Erlenmeyerově baňce bylo smícháno 0,65 g agarosy a 65 ml TAE pufru. Směs byla rozpuštěna ohřevem v mikrovlnné troubě, po ochlazení přibližně na  $45^{\circ}\text{C}$  byly do roztoku

přidány 3  $\mu$ l barviva GoodView. Roztok byl promíchán a nalit do elektroforetické aparatury. Po ztuhnutí byl z gelu vyjmut hřeben. Gel byl převrstven dH<sub>2</sub>O, do prostoru elektrod bylo nalito příslušné množství TAE pufru (dle návodu výrobce). Do jamek vzniklých vyjmutím hřebenu byly nanášeny vzorky smíchané se vzorkovým pufrům a DNA standard. Elektroforetické dělení probíhalo po dobu 15 min při 220 V. Fragmenty DNA byly vizualizovány pod UV prosvěcovací lampou, kdy barvivo interkalované do DNA svítilo žlutozeleně.

## **4.2. Produkce rekombinantní nitrilasy a kyanidhydratasy**

### **4.2.1. Produkce v buňkách *E. coli* BL21-Gold (DE3)**

Nejprve byla provedena transformace buněk *Escherichia coli* kmene BL21-Gold (DE3) připravenými plasmidy. Vždy bylo přidáno 5  $\mu$ l plasmidu k 100  $\mu$ l kompetentních buněk. Dále se postupovalo stejně jako v odstavci 4.1.1.

Po inkubaci bylo na každou Petriho misku obsahující bakteriální kolonie nanášeno malé množství LB-média, ve kterém byly bakterie rozmíchány a převedeny do 500 ml LB-média s příslušným antibiotikem (z každé misky byly rovným dílem zaočkovány čtyři 2 l Erlenmeyerovy baňky). Kultivace probíhala na orbitální třepačce při 220 ot.min<sup>-1</sup> a 37 °C, přičemž byla průběžně měřena optická hustota při 550 nm proti LB-médiu. Jakmile bylo dosaženo OD<sub>550</sub> v rozmezí 0,8 až 1 byla kultura zchlazena na 25 °C při 200 ot.min<sup>-1</sup>. Následně byl z každé Erlenmeyerovy baňky odebrán 1 ml vzorek na SDS-PAGE a byla indukována exprese přidáním 250  $\mu$ l 1 M IPTG do výsledné koncentrace 0,5 mM. Kultivace dále pokračovala po následujících cca 16 hodin.

Po 16 hodinách byl opět z každé baňky odebrán 1 ml vzorek na SDS-PAGE a zbytek produkce bylo sklizeno centrifugací v 250 ml kyvetách (20 min, 4500  $\times$  g). Pelety byly resuspendovány ve 20 ml TES pufru, převedeny do 50 ml zkumavek s víčkem a odstředěny 15 min při 4500  $\times$  g. Supernatant byl odstraněn a pelety zmrazeny do dalšího zpracování.

### **4.2.2. Produkce v buňkách *Escherichia coli* SHuffle T7 Express**

Kompetentní buňky *E. coli* SHuffle T7 Express byly vyjmuty z mrazícího boxu a ponechány rozmraznout v ledové lázni. Pak bylo k 60  $\mu$ l buněk přidáno 5  $\mu$ l příslušného

plasmidu, směs byla promíchána a inkubována 10 minut na ledu. Následně se ke směsi přidal 1 ml LB-média a následoval stejný postup jako v odstavci 4.1.1.

Druhý den byla vybraná kolonie transformovaných buněk v laminárním boxu přeočkována z agarové plotny do 50 ml zkumavky s víčkem s 5 ml LB-média a 5  $\mu$ l příslušného antibiotika. Zkumavky s povoleným víčkem byly přes noc umístěny na třepačku při 30 °C a 220 ot.min<sup>-1</sup>.

Ráno byla kultura z jedné zkumavky rozdělena do dvou sterilních Erlenmeyerových baněk s 0,5 l LB-média a daným antibiotikem. Následně se postupovalo jako v kapitole 4.2.1., jen se lišily použité teploty, před indukcí probíhala kultivace při 30 °C a po dosažení požadované optické hustoty byla třepačka přenastavena na 20 °C.

### **4.3. Purifikace proteinů**

#### **4.3.1. Příprava pelety před první chromatografií**

Peleta byla vyjmuta z mrazicího boxu, nechána volně rozmraznout a pak k ní bylo přidáno 40 ml pufru A s přidavkem inhibitorů (1  $\mu$ M leupeptin, 1 mM PMSF a 10 mM EDTA) a 4 mg lysozymu. Tato směs byla inkubována 30 min při laboratorní teplotě, pak k ní byl v případě přípravy redukováného proteinu přidán 1 ml 2 M DTT a ihned byla provedena desintegrace buněk použitím sonikátoru Sonoplus. Sonikace proběhla 4  $\times$  1 min při 40 % amplitudě a pulsu 0,5 s. Mezi jednotlivými desintegračními kroky byla směs chlazená na ledu. Následně byl buněčný lyzát rozdělen do dvou 30 ml centrifugačních zkumavek typu Oak ridge a centrifugován 10 min při 15300  $\times$  g. Supernatant byl převeden do čistých zkumavek a proběhla další centrifugace za stejných podmínek. Následně byl supernatant zfiltrován injekční stříkačkou přes filtr s velikostí pórů 0,22  $\mu$ m.

#### **4.3.2. Ionově výměnná chromatografie na koloně Q-Sepharose FF**

Chromatografie byla prováděna na soustavě FPLC ÄKTAprime plus a vzorek byl nanášen pomocí tzv. Superloop 150 ml smyčky. Přefiltrovaný buněčný extrakt byl naředěn pufrům A (s přidavkem inhibitorů 1  $\mu$ M leupeptin, 1 mM PMSF a 10 mM EDTA) v poměru 1: 1 a nanesen na iontoměničovou kolonu Q-Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow při průtoku 5 ml.min<sup>-1</sup>. Promytím pufrům A se odstranily nečistoty a nenavázané složky. U vzorku

s kyanidhydratasou byla následně provedena pufrům B eluce zachycených proteinů rychlostí  $3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  s lineárním gradientem NaCl (z pufru A se 150 mM NaCl do pufru B s 500 mM NaCl) za 180 ml. Frakce byly do 50 ml zkumavek s víčkem sbírány manuálně. Po ukončení práce byla kolona promyta 1M NaCl,  $\text{dH}_2\text{O}$ , 1M NaOH,  $\text{dH}_2\text{O}$ , 1M HCl a uskladněna ve 20 % EtOH. Jímané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz kapitola 4.4.1).

U nitrilasy NitAB byl aplikován stejný postup, jen se lišilo pH použitých pufrů a eluční krok. Zde byla použita série lineárních gradientů. Nejprve byl nastaven gradient z 0 do 15 % pufru B za 10 min při průtoku  $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , po ustálení byl zvýšen z 20 do 30 % pufru B během 10 minut a nakonec byl po ustálení křivky zvýšen z 30 do 100 % pufru B za 10 min.

#### **4.3.3. Zakoncentrování proteinů**

Příslušné frakce byly spojeny a zakoncentrovány pomocí koncentrátorů Amicon Ultra. Membrána v tomto filtračním zařízení je schopna zadržovat molekuly o relativní molekulové hmotnosti větší než 10000. Hnací silou transportu vzorku skrz membránu je centrifugační síla. Koncentrátory s frakcemi byly centrifugovány při  $4500 \times g$  a  $20^\circ\text{C}$ . Mezi doplňováním koncentrátorů byla koncentrace proteinů ve filtrátu sledována metodou dle Bradfordové, jestli není poškozená membrána a nepropouští i proteiny. Po použití byly koncentrátory vymyty  $\text{dH}_2\text{O}$ , ve které byly posléze v lednici i uchovávány, aby membrána nevysychala.

#### **4.3.4. Gelová permeační chromatografie**

Chromatografie byla prováděna na HPLC systému ÄKTAbasic. Systém byl promyt  $\text{dH}_2\text{O}$ , při průtoku  $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  byla připojena kolona Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL a nastaven tlakový limit 1,5 MPa. Po ekvilibrování kolony pufrům určeným pro gelovou chromatografii, byla následně nejprve pomocí injekční stříkačky s tupou jehlou promyta smyčka mobilní fáze, pak byl na kolonu aplikován zakoncentrovaný vzorek pomocí mikrostříkačky Hamilton a spuštěna přednastavená metoda. Jímané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (kapitola 4.4.1.) a frakce o stejné čistotě byly spojeny. Po ukončení chromatografie byla kolona převedena do 20 % EtOH a tak uchovávána.

#### **4.3.5. Ionově výměnná chromatografie na koloně Source 15Q**

K HPLC systému ÄKTAbasic byla při průtoku  $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  připojena kolona a byl nastaven tlakový limit 4,0 MPa. Nejprve byla kolona promyta pufrům C, pak pufrům D a nakonec ještě pufrům C při průtoku  $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Po promytí byl na kolonu o stejném průtoku nanesen přefiltrovaný vzorek přes  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$  filtr. Následovalo promytí pufrům C a byl nastaven gradient k eluci zachyceného proteinu. Eluce proběhla ve třech krocích, nejdříve z 0 do 20 % nasycení pufrům D za 5 min, pak z 20 do 50 % pufru D za 60 min a nakonec z 50 do 100 % pufru D během 10 min. Frakce byly sbírány manuálně do 1,5 ml mikrozku mávek a analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz 4.4.1.).

#### **4.3.6. Optimalizace skladování enzymů v redukované formě**

Purifikované enzymy uložené v HEPES pufru s 5 mM tris(2-karboxyethyl)fosfinem (TCEP, z angl. tris-(2-carboxyethyl)phospine) byly rozděleny po 300  $\mu\text{g}$  do 1,5 ml mikrozku mávek. Jedna mikrozku mávka zůstala v tomto složení, do další byl přidán 1 % roztok glycinu, do jiné 10 % roztok sacharosy a do poslední 20 % roztok glycerolu. V těchto podmínkách byl protein zmražen při  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 7 dní. Následně byly vzorky rozmrazeny a zcentrifugovány 6 min při  $18\,000 \times g$ . Obsah každé mikrozku mávky byl rozdělen na poloviny, jedna část určená pro stanovení enzymové aktivity byla opět zmrazena a s druhou částí byla provedena gelová fitrace na koloně Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL (viz 4.3.4). Jako mobilní fáze byl použit roztok o složení: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH = 7,5.

### **4.4. Charakterizace připravených proteinů**

#### **4.4.1. Elektroforéza v prostředí SDS**

Polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) byla užívána k vizualizaci a separaci proteinů. Metoda využívá rozdílné elektroforetické pohyblivosti proteinu ve stejnosměrném elektrickém poli [48].

Nejprve byla sestavena elektroforetická aparatura. Pak byl mezi skla aplikován roztok separačního gelu, který byl převrstven dH<sub>2</sub>O a ponechán ztuhnout. Po ztuhnutí byla voda



odstraněna a byl nanesen roztok zaostřovacího gelu, do kterého byl vložen hřeben na vytvoření jamek pro vzorky. Podle počtu vzorků byl použit 10-ti či 15-ti jamkový hřeben. Složení jednotlivých gelů uvádí tabulka č. 1. Po ztuhnutí horního gelu byl hřeben vyjmut, skla byla vložena do vaničky a elektrodový prostor byl naplněn elektrodovým pufrem.

Neredukovaný vzorek byl připraven smícháním 10  $\mu$ l preparátu s 10  $\mu$ l 2  $\times$  koncentrovaného neredukujícího vzorkového pufru a redukovaný vzorek byl připraven stejným způsobem s využitím redukujícího vzorkového pufru. Pak byly vzorky 5 min povařeny, krátce centrifugovány a nanášeny do jamek (10  $\mu$ l vzorku na jamku).

Elektroforéza probíhala při napětí 200 V po dobu 50 – 60 min. Po ukončení elektroforézy byla skla opatrně oddělena, byl odstraněn horní zaostřovací gel a separační gel byl barven barvicím roztokem pro SDS-PAGE. Pak následovalo odbarvování v odbarvovací lázni.

**Tab. 1:** Složení separačního a zaostřovacího gelu (množství potřebné pro dva 15 % gely).

Separační gel		Zaostřovací gel	
Látka	V [ml]	Látka	V [ml]
dH <sub>2</sub> O	1,8	dH <sub>2</sub> O	1,4
30 % AA	4,0	30 % AA	0,5
1,5M Tris, pH = 8,8	2,0	0,5M Tris, pH = 6,8	0,25
10 % SDS	0,08	10 % SDS	0,02
TEMED	0,004	TEMED	0,003
10 % APS	0,08	10 % APS	0,02

#### 4.4.2. Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace přečištěných proteinů byla stanovena metodou dle Bradfordové s využitím roztoků BSA v koncentračním rozmezí 0 - 1 mg.ml<sup>-1</sup> jako standardu. Metoda je založena na kolorimetrické reakci. Po smísení specifického činidla s proteinem se kyselé barvivo Coomassie Brilliant Blue G250, obsažené v činidlu, adsorbuje na bazické a neutrální aminokyselinové zbytky a dojde k posunu absorpčního spektra ze 465 na 595 nm, což se projeví změnou barvy roztoku, která je úměrná množství proteinu.

Do jamek 96-ti jamkové mikrotitrační destičky bylo k 5  $\mu$ l vzorku nebo roztoku standardu přidáno 200  $\mu$ l činidla dle Bradfordové, směs byla promíchána a ponechána

5 min inkubovat při laboratorní teplotě. Následně byla určena koncentrace proteinu, v případě kdy šlo jen o orientační stanovení, byla koncentrace proteinu odhadnuta vizuálním porovnáním intenzity zabarvení vzorků a kalibrační řady. Pro přesnější stanovení byla změřena absorbance při 595 nm na čtečce mikrotitračních destiček. Naměřená data ze čtečky byla automaticky převedena do programu Microsoft Excel a v něm vyhodnocena. Vzorky byly pipetovány v triplicátech pro lepší přesnost výsledku.

#### **4.4.3. Stanovení enzymové aktivity**

Enzymová aktivita CNH a NitAB byla stanovena v Laboratoři biotransformací, MBÚ AV ČR, v.v.i. ve spolupráci s Ing. Annou Rinágelovou dle publikovaných protokolů [15,26]. Aktivita kyanidhydratasy byla měřena k KCN a aktivita nitrilasy k fenylacetonitrilu. Enzym s puftrem (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH = 8,0) byl za stálého třepání při 850 ot.min<sup>-1</sup> preinkubován 5 min při 30 °C, následně byl přidán příslušný substrát a po 5 min třepání při 30 °C byla reakce zastavena přidavkem 200 µl 100 % MeOH v případě KCN jako substrátu nebo přidavkem 20 µl 2 M HCl u reakce, jejímž substrátem byl fenylacetonitril. Po stočení byly produkty a substráty analyzovány pomocí HPLC.

#### **4.4.4. Sedimentační analýza**

Metoda sedimentační analýzy pomocí analytické ultracentrifugy sloužila pro určení oligomerního stavu proteinu, ověření homogenity či heterogenity vzorku a jeho případné agregace. Byla použita metoda sedimentační rychlosti za využití dvoukomorové cely, do jedné části byl pipetován roztok proteinu a do druhé části příslušný pufr jako reference. Primárním výsledkem sedimentačně rychlostního experimentu je přesná hodnota sedimentačního koeficientu molekuly, ze které lze dále odhalit její tvar a velikost [49].

Měření proběhlo na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I (rotor An50Ti) a provedl ho i s jeho vyhodnocením RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D. Do kyvety bylo vždy pipetováno 400 µl vzorku proteinu a 420 µl pufru jako reference (koncentrace proteinů a použité pufrы jsou uvedeny na příslušných místech ve výsledkové části). Měření probíhalo při 30000 ot.min<sup>-1</sup> a 20 °C. Sedimentace vzorku byla sledována absorpční optikou při vlnové délce 280 nm a bylo sbíráno 200 snímků po 5 min. Hustota a viskozita

použitého pufru, stejně jako parciální specifické objemy analyzovaných vzorků byly predikovány za pomoci programu SEDNTERP [50] a získaná data byla následně vyhodnocena s využitím programu SEDFIT [51].

#### **4.4.5. Hmotnostní spektrometrie pro stanovení disulfidických můstků**

Metoda hmotnostní spektrometrie (MS, z angl. mass spectrometry) byla využita pro určení disulfidických můstků v připraveném proteinu, neboť správná tvorba disulfidových vazeb v proteinech je klíčová pro jejich stabilitu a funkci.

Analýza spočívá v přesném změření relativní molekulové hmotnosti, resp. poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ) peptidových štěpů daného proteinu v oxidačním prostředí a zjištění disulfidového spojení mezi konkrétními cysteiny v molekule. Vlastní měření i jeho vyhodnocení provedl Mgr. Zdeněk Kukačka v Laboratoři charakterizace molekulární struktury, MBÚ AV ČR, v.v.i dle protokolu [52].

#### **4.4.6. Dynamický rozptyl světla**

Měření dynamického rozptylu světla (DLS, z angl. dynamic light scattering) bylo provedeno na přístroji Zetasizer Nano ZS vybaveného He-Ne laserem o vlnové délce 633 nm a provedla ho i s jeho vyhodnocením RNDr. Kateřina Hofbauerová, PhD. (Fyzikální ústav, Matematicko-fyzikální fakulta, UK Praha). Proteinové vzorky byly před měřením zfiltrány přes 0,1  $\mu\text{m}$  centrifugační filtry Ultrafree<sup>®</sup>-MC, aby se odstranily prachové částice, které by rušily stanovení. Preparáty byly měřeny v křemenné kyvetě 3  $\times$  3 mm o objemu 40  $\mu\text{l}$  pod úhlem 173° při 20 °C. Každý proteinový vzorek byl změřen 10 $\times$ . Výsledky byly zpracovány pomocí softwaru Zetasizer 6.2.

#### **4.4.7. Ramanova spektroskopie**

Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (DCDR, z angl. drop coating deposition Raman) byla provedena RNDr. Vladimírem Kopeckým Jr., PhD. (Fyzikální ústav, Matematicko-fyzikální fakulta, UK Praha). Tato technika je založena na efektu kávového kroužku a umožňuje nedestruktivní spektroskopická měření roztoků biomolekul s koncentrací až 1  $\mu\text{M}$  [53].

Nejprve byly proteinové vzorky s koncentrací 0,5  $\text{mg.ml}^{-1}$  dialyzovány na speciálních filtrech s velikostí pórů 0,0025  $\mu\text{m}$  proti  $\text{dH}_2\text{O}$  po dobu 30 min. Následně byly 2  $\mu\text{l}$

proteinového roztoku nanoseny na destičku SpectRIM™, vzorek se nechal vyschnout při pokojové teplotě a získaný povlak se zkoumal pomocí Ramanovy spektroskopie. Měření bylo provedeno na Ramanově mikrospektrometru LabRAM HR 800 vybaveným interním laserem s vlnovou délkou 632,82 nm. Spektra byla integrována po dobu 600 s za užití mřížky a CCD detektoru chlazeného kapalným dusíkem. Sekundární struktury proteinů byly predikovány z pásu amidu I [54].

#### **4.5. Krystalizace proteinů**

Krystalizace vyčištěných redukovaných preparátů NitAB a CNH byla prováděna v Laboratoři strukturní biologie, BTÚ AV ČR, v.v.i., pod dohledem Mgr. Jana Bláhy a RNDr. Jiřího Pavlíčka, Ph.D. Krystalizační experimenty byly prováděny metodou tzv. sedící kapky.

Nejprve bylo do 3×96-ti jamkové krystalizačních destiček Intelli-plate 96 pomocí automatického pipetovacího robota Crystal Gryphon nanесeno srážedlo z komerční sady JCSG Core I-IV Suites nebo JCSG+ Suite. Krystalizační kapka pak byla vytvořena smícháním roztoků proteinu a daného rezervoáru. Aby nedocházelo k vysychání roztoku, byla destička přelepena průhlednou izolační fólií a ponechána v klidu v krystalizační místnosti. Průběžně v několikadenních odstupech byly krystalizační pokusy sledovány pomocí optického mikroskopu s polarizačním filtrem.

## 5. Výsledky

### 5.1. Příprava expresních vektorů

Práce byla zaměřena především na nitrilasu z *Arthroderma benhamiae* (NitAB) a kyanidhydratasu z *Aspergillus niger* (CNH), jejichž sekvence jsou uvedeny na obr. 4, str. 38. Konstrukty obou proteinů byly vloženy do expresního plasmidu pET-30a(+). Dílčí část je dále věnována nitrilase z *Aspergillus niger* K10 (NitAN). Gen pro NitAN nebyl vložen do plasmidu pET-30a(+), jako u NitAB a CNH, nýbrž do plasmidu pET-22b(+), který nese rezistenci na ampicilin. Aminokyselinová sekvence NitAN je zobrazena též na obr. 4, str. 38. Zásobní množství plasmidu NitAB jsem převzala od Davida Illéše, který s proteinem pracoval v předešlém roce v rámci své bakalářské práce [55].

Má práce začala přípravou zásobního množství plasmidů kyanidhydratasy a nitrilasy z *Aspergillus niger* ze vzorků dodaných z MBÚ AV ČR, v.v.i. (4 µg) postupem uvedeným v kapitole 4.1. Čistota a koncentrace připravené plasmidové DNA byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 260 a 280 nm. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2. Jak vyplývá z poměru absorbancí  $A_{260}/A_{280}$ , je čistota obou připravených plasmidových DNA vyhovující (uváděná optimální hodnota čisté DNA je 1,8). Správná délka a celistvost plasmidů byla ještě ověřena pomocí agarosové elektroforézy dle postupu 4.1.4. (obrázek není součástí práce).

**Tab. 2: Koncentrace a čistota připravených zásobních roztoků plasmidů.**

Plasmid	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	c [µg/µl]
pET22b(+)_NitAN	0,262	0,148	1,77	3,39
pET30a(+)_CNH	0,161	0,091	1,77	2,42

A)

MSGPALKVAITQAQPKWLDLAGSVEKTVNLIAEAAKGDARLVAFPECWIPGYPG  
WIWQRPVDPITTKYIQNSLSVNSAEMNTIKSAAKENNIAVVLGFVEAIDTHSVYIAQ  
AIISPKGELLMHRRKIKPTHMETVFGDGSGLDNTNVADVDFFGGDIGVVKVGTLA  
WEHALPLLKYHTYSQKEAIIHAMWPPIDPHPGVAPALWSMSAEGCQNLSQTHAIE  
GGAYVLHCTAVCNEEGIEGMKTKGGLLFQEPGGGHSAAIAGRRLTKPLADGNPA  
AEGIVYADLDMARVVMNKGFDVVGHYSRPDLLWLGVDKAQKGCVVVPKREPEQ  
DV

B)

MAPVLKKYKAAAVNAEPGWFNLEESVRRTIHWIDEAGKAGCKFIAFPPELWIPGY  
YWMWKVNYQESLPLLKKYRENSLPSDSDDEMRRIRNAARANKIYVSLGYSEVDLA  
SLYTTQVMISPSGDILNHRRKIRATHVERLVFGDGTGDTTESVIQTDIGRVGHLNC  
WENMNPFMKAYAAASLGEQVHVAAWPLYPGKETLKYDPFTNVAEANADLVTPA  
YAIETGTYTLPWQTITAEGIKLNTPPGKDLEDPHIYNHGRIFGPDGQNLVPHDPK  
DFEGLLFVDIDLDECCHLSKSLADFGGHYMRPDLIRLLVDTNRKDLVVREDRVNGG  
VEYTRTVDRVGLSTPLDIANTVDSEN

C)

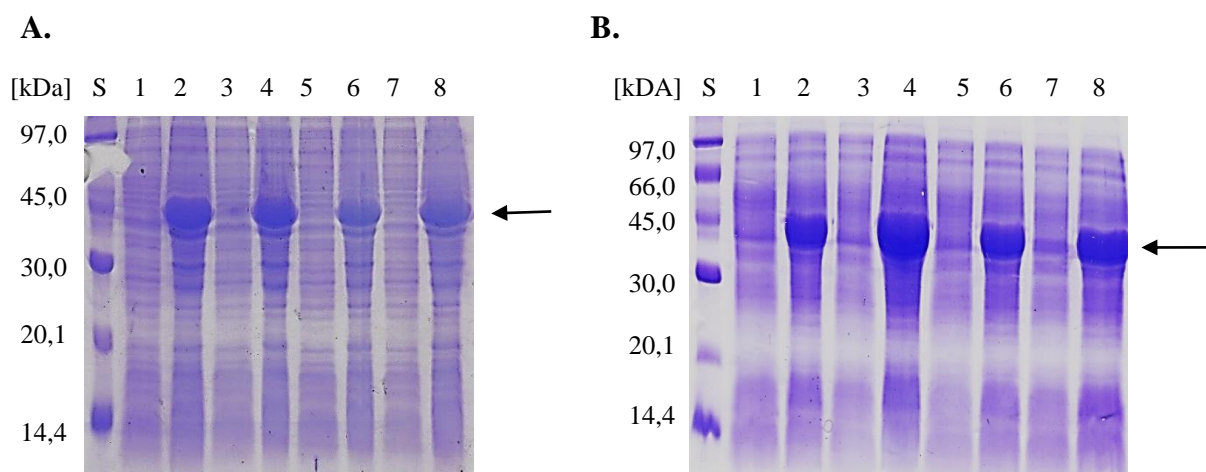
MSHDGPKTIRVAAVQAEPEWNNLQKGVEKTIRLIIEAGKNGANVMGFPEVWIPGY  
PWSIWNQSVVDNVEFMDEYFRNSLERDSEEMNRIRCAVKEAGIFCVLGYSERYQG  
SLYISQSFIDENGDIVHHRRKIKPTHVERGFWGEGQADSLKSVMKSSFGNIGGLNC  
WEHTQTLLRYEYEAQNVDIIHASWPLIFGACAEMQYHISSEMCGKLTQVMSMEG  
ACFTLICSQVMSAENCERNKVDKWSFVKAPGGGFSMIYGPAGEPLVEAPDAGEEV  
ILYADVLAEKWRAKQNLDDVVGHYSRPDLLSLKVTNNAASQVHFA

**Obr. 4: Primární struktura připravovaných enzymů:** A) NitAB, 335 aminokyselin; B) CNH, 356 aminokyselin; C) NitAN, 320 aminokyselin. Žlutě jsou podbarveny všechny cysteiny a červeně je označen cystein v aktivním místě enzymu.

## 5.2. Rekombinantní exprese kyanidhydratasy a nitrilasy z *Aspergillus niger* a nitrilasy z *Arthroderma benhamiae*

Produkce proteinů v kompetentních buňkách *E. coli* BL21-Gold (DE3) byla provedena postupem popsáným v kapitole 4.2.1. Indukce exprese proteinů byla provedena přidavkem IPTG na výslednou 0,5 mM koncentraci. Obr. 5, str. 39 ukazuje vzorky buněk odebraných před a 16 hodin po indukci. Z obrázku je patrné, že po přidání induktoru začala masivní produkce proteinů CNH a NitAN s očekávanou velikostí 40 a 36 kDa.

Produkce NitAB nebyla v rámci této práce prováděna, zamražené pelety naprodukovaného proteinu jsem převzala od Davida Illéše [55].



**Obr. 5: Expresa kyanidhydratasy a nitrilasy v buňkách *E. coli* BL21-Gold (DE3).** Byl použit 15 % separační gel. Dráha S představuje standard; v drahách 1, 3, 5, 7 jsou buňky před indukcí a v drahách 2, 4, 6 a 8 buňky po indukci 0,5 mM IPTG. **A.** se vztahuje ke kyanidhydratase s velikostí 40 kDa a **B.** k nitrilase s velikostí 36 kDa z organismu *Aspergillus niger*.

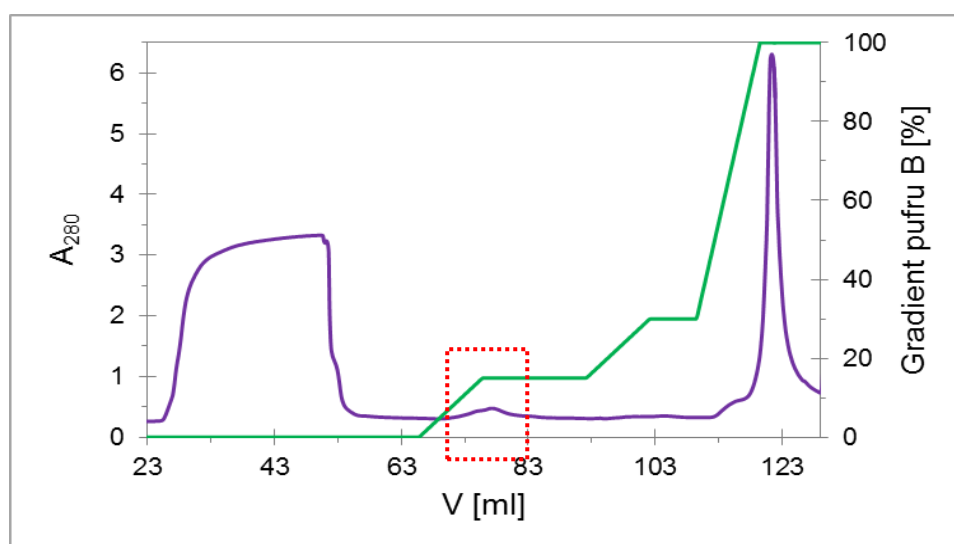
### 5.3. Purifikace proteinů

U obou enzymů byla při čištění využita série kapalinových chromatografií. Chemické složení pufrů u NitAB i CNH bylo stejné, rozdílné však bylo jejich pH u iontové výměnné chromatografie vzhledem k různým hodnotám izoelektrického bodu (pI) jednotlivých proteinů. Teoretická hodnota pI pro NitAB je 5,77 a pro CNH 5,43 [56]. Původně byly proteiny purifikovány jen v redukčním prostředí, později se však přistoupilo k přečišťování i neredukovaných preparátů v oxidačních podmínkách bez jakéhokoliv přídavku DTT či merkaptoethanol, aby bylo možné porovnat chování proteinů v odlišných prostředích. Vliv redukce na oligomerní stav nitrilas byl pozorován již v předchozích studiích, ale zatím nebylo provedeno žádné srovnání.

#### 5.3.1. Purifikace nitrilasy z *Arthroderma benhamiae* produkované v *E. coli* BL21-Gold (DE3)

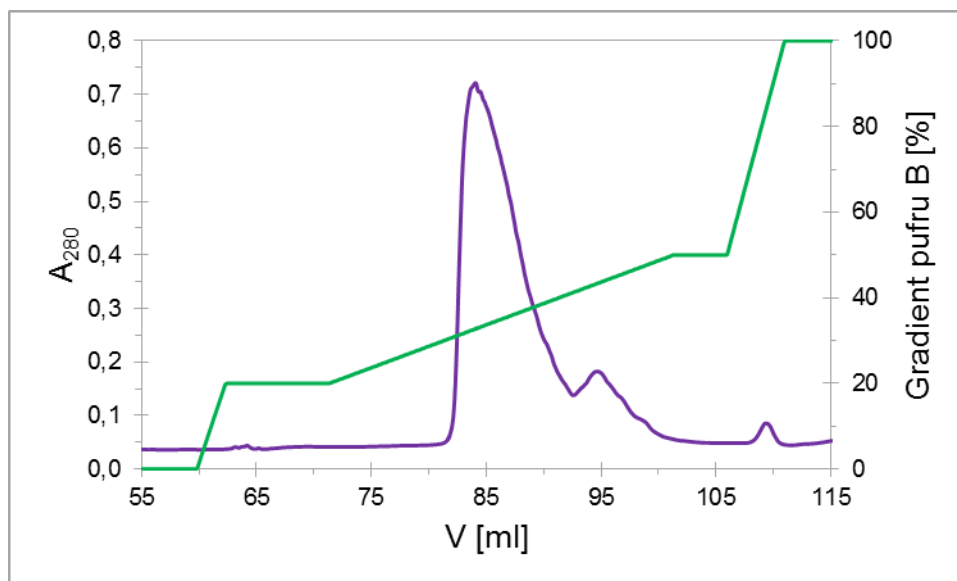
U NitAB byl s menšími obměnami využit analogický postup, který v naší laboratoři používal v předchozích pokusech David Illés [55]. Změny se týkaly přídavku inhibitorů peptidas - univerzálního inhibitoru EDTA a leupeptinu s PMSF zaměřeným především proti serinovým proteasám. Dále byly pozměněny gradienty při eluci u ionexových chromatografií a složení pufru pro gelovou chromatografii.

Prvním krokem po zpracování pelety byla iontově výměnná chromatografie na koloně Q-Sepharose™ Fast Flow s využitím pufru A (se 150 mM NaCl) a B (s 500 mM NaCl) o pH = 8,0. Po nanesení vzorku na kolonu byla spuštěna série lineárních gradientů, jak je uvedeno v kapitole 4.3.2. Nitrilasa byla eluována v prvním kroku z 0 do 15 % obsahu pufru B. Průběh chromatografie byl monitorován měřením absorbance při 280 nm. Záznam chromatogramu redukovaného (RED) vzorku je uveden na obr. 6, pro větší přehlednost není v grafu uvedena křivka neredukované formy (NERED), která vypadala velmi podobně. Přítomnost nitrilasy v najímaných frakcích byla ověřena pomocí SDS-PAGE. Jednotlivé frakce o přibližně stejné čistotě byly spojeny, převedeny pomocí koncentrátorů do pufru C, čímž došlo k jejich odsolení a současně byly zakoncentrovány na 3 až 4 ml. Následně byl vzorek aplikován na kolonu Source™ 15Q 4.6/100 PE pomocí 7 ml smyčky. I při této ionexové chromatografii byla využita série lineárních gradientů (viz kapitola 4.3.5.), tentokrát byl ale protein eluován v druhém kroku gradientu (při 20 – 50 % obsahu pufru B). Eluční profil RED NitAB ilustruje obr. 7, str. 41. Po SDS-PAGE byly frakce o stejné čistotě opět spojeny, zakoncentrovány a po 500 µl nanесeny na kolonu Superdex™ 200 10/300 GL. Záznam gelové filtrace RED i NERED NitAB je zobrazen na obr. 8, str. 41. Eluční vrchol nitrilasy odpovídal retenčnímu objemu 12 ml (v případě NERED 12,34 ml a u RED 12,12 ml). Odlišnost hodnot retenčních časů je pravděpodobně dána pouze rozdílným zakoncentrováním vzorků před nanesením na kolonu.

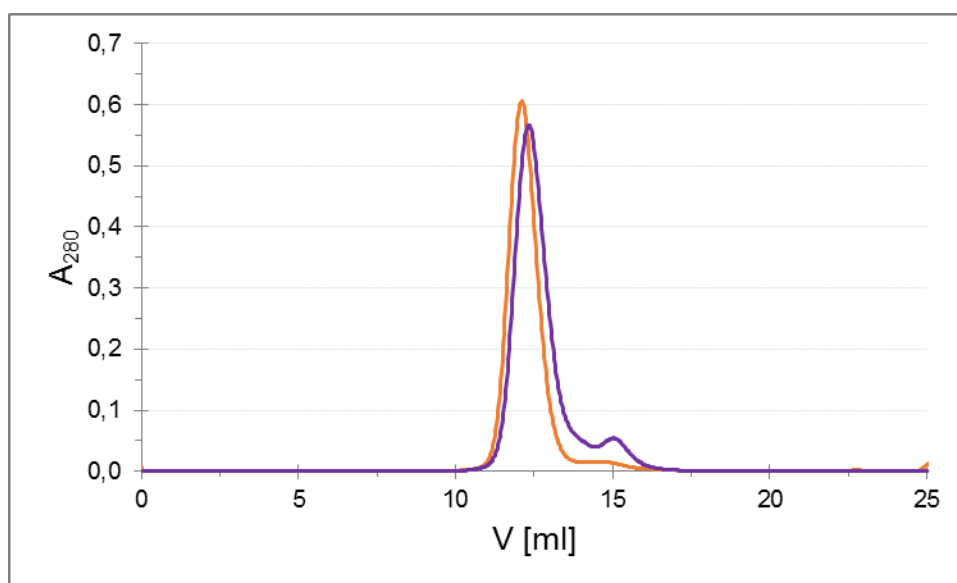


**Obr. 6: Průběh chromatografie NitAB na koloně Q-Sepharose™ Fast Flow.** Fialová křivka znázorňuje absorpční profil při 280 nm. První pík odpovídá nanášece na kolonu, druhý malý (ohrazen červene) eluci našeho proteinu, ve třetím píku jsou už jen nečistoty bez NitAB, což bylo ověřeno pomocí SDS-PAGE. Zeleně je zaznamenán gradient pufru B.





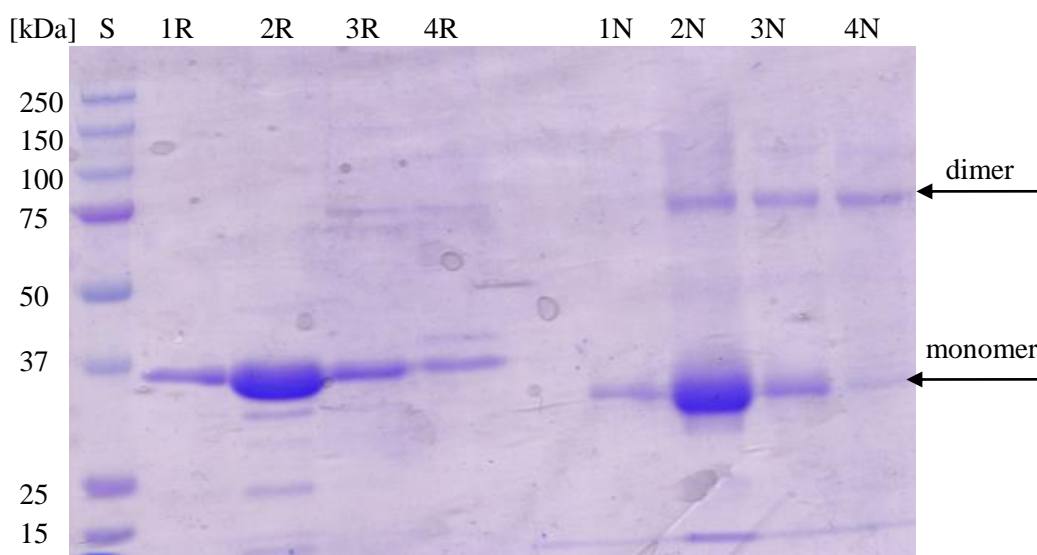
**Obr. 7: Eluční profil iontové chromatografie redukované NitAB na koloně Source™ 15Q 4.6/100 PE.** Fialová křivka znázorňuje absorpční profil při 280 nm. Zeleně je zaznamenán gradient pufru B.



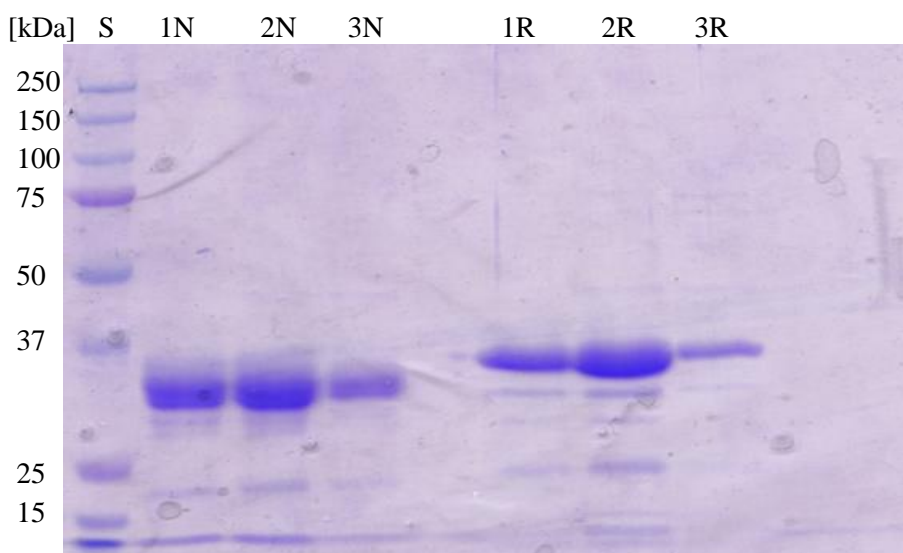
**Obr. 8: Záznam z gelové filtrace pro NitAB.** Separace proběhla na koloně Superdex™ 200 10/300 GL. Nanášeno bylo 500 µl vzorku. Fialová křivka zobrazuje NERED vzorek, oranžová RED vzorek.

U následné SDS-PAGE provedené s posbíranými frakcemi při gelové chromatografii byla pozorována v neredukujícím prostředí u NERED preparátu přítomnost vyšší oligomerní formy o velikosti 75 kD, tento dimer se v redukujícím prostředí rozpadá na monomer, viz obr. 9. U RED vzorku tento jev nebyl zaznamenán.

**A.**



**B.**



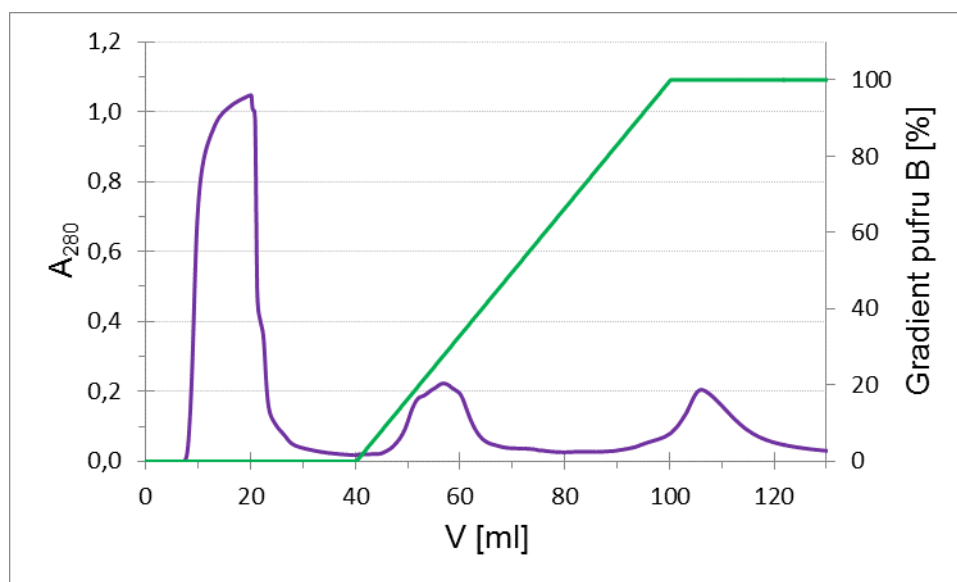
**Obr. 9: SDS-PAGE frakcí posbíraných při gelové chromatografii NitAB. A. NERED protein, B. RED protein.** Byl použit 12,5 % separační gel. Vzorky v drahách jsou označeny číslem dané frakce a písmenem R a N jsou rozlišeny, v jakém prostředí proběhla separace (redukováném a neredukovaném), dráha S obsahuje proteinový standard. Teoretická hmotnost monomerní NitAB je 37 kDa.

### 5.3.2. Purifikace kyanidhydratasy z *Aspergillus niger*

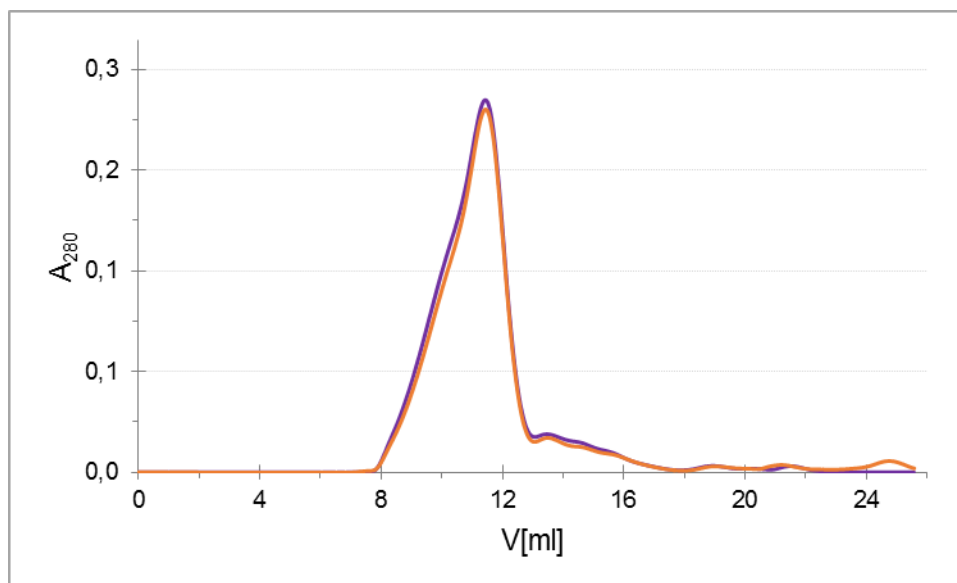
S kyanidhydratasou byl postup složitější, jelikož se s tímto enzymem v naší laboratoři pracovalo poprvé. Bylo potřeba zvolit vhodnou kolonu a najít optimální pH používaných pufrů. Jako nejlepší postup pro získání čisté kyanidhydratasy se osvědčilo použití nejprve iontové výměnné chromatografie s následnou gelovou filtrací.

Iontově výměnná chromatografie byla prováděna na koloně Q-Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow 16/10. Protein byl eluován lineárním gradientem chloridu sodného (150 – 500 mM) rychlostí 3 ml.min<sup>-1</sup> po dobu 1 hod. Záznam chromatogramu redukované formy je uveden na obr. 10, pro neredukovanou není uváděn, protože vypadal velmi podobně. Frakce obsahující kyanidhydratasu (ověřeno pomocí SDS-PAGE) byly spojeny, zakoncentrovány a naneseny na kolonu Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL. Eluční vrchol kyanidhydratasy odpovídal vždy retenčnímu objemu kolem 11 ml, viz obr. 11, str. 44, kde pro RED i NERED vzorek činí 11,43 ml.

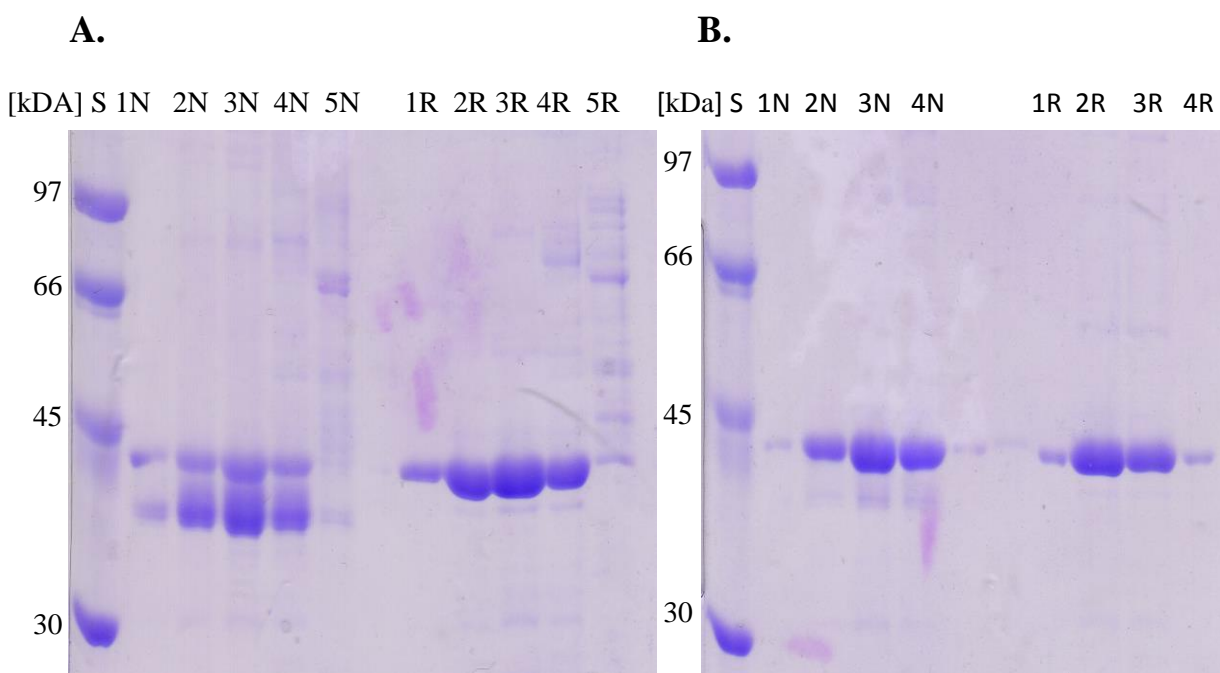
U kyanidhydratasy v RED i NERED formě nebyly zaznamenány žádné větší rozdíly, v chromatografickém záznamu, byly však pozorovány změny na SDS-PAGE po gelové filtraci (obráz. 12, str. 44).



**Obr. 10: Chromatogram z ionexové chromatografie pro RED CNH.** Separace byla provedena na koloně Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow. **Fialová** křivka znázorňuje absorpční profil při 280 nm. První pík odpovídá nanášece na kolonu, druhý eluci CNH, ve třetím píku jsou už jen nečistoty bez CNH, což bylo ověřeno pomocí SDS-PAGE. **Zeleně** je zaznamenán lineární gradient pufru B.



**Obr. 11: Záznam chromatogramu z gelové filtrace pro CNH.** Separace proběhla na koloně Superdex™ 200 10/300 GL. Nanáška vzorku činila 500  $\mu$ l. Fialová křivka zobrazuje NERED vzorek, oranžová RED vzorek.



**Obr. 12: SDS-PAGE frakcí posbíraných při gelové chromatografii CNH. A. NERED protein, B. RED protein.** Byl použit 12,5 % separační gel. Vzorky v drahách jsou označeny číslem dané frakce a písmenem R a N jsou rozlišeny, v jakém prostředí proběhla separace (redukovaném a neredukovaném), dráha S obsahuje proteinový standard. Teoretická hmotnost CNH je 40 kDa.

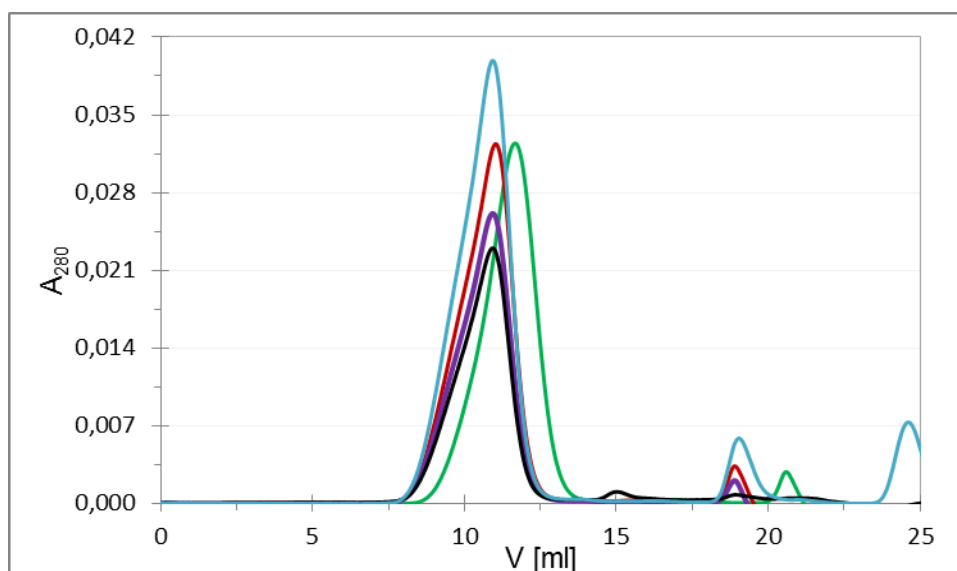
### 5.3.3. Purifikace nitrilasy z *Aspergillus niger*

Purifikace nitrilasy z *Aspergillus niger* K10 se nezdařila, jelikož enzym zůstal v nerozpustné frakci. Nalezení vhodného způsobu vyčištění této nitrilasy bude předmětem dalšího bádání.

### 5.3.4. Skladování redukované CNH s přidavkem různých roztoků

Po 7 dnech skladování v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  byl enzymový preparát s 5 mM TCEPem (RED CNH v pufru o složení 10 mM HEPES; 150 mM NaCl; 10 mM  $\text{NaN}_3$ ; 10 mM  $\beta$ -ME; pH = 7,5) uložený v různých roztocích rozmražen, zcentrifugován a nanesen na kolonu Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL. Ve všech případech bylo nanášeno přibližně 150  $\mu\text{g}$  proteinu. Eluční křivky jsou shrnuty na obr. 13. I když tvar píku zůstal stejný, docházelo k poklesu absorbance a v případě, kdy byl enzymový preparát zamražen jen v pufru s přidavkem TCEPu se posouval i retenční čas. Z toho vyplývá, že ani jeden způsob není vhodný pro dlouhodobé skladování.

Při dalších purifikacích se již při gelové chromatografii přešlo k používání Tris pufru, ve kterém se zvýšila hodnota pH o jednotku oproti dříve používanému HEPES pufru s cílem zvýšit stabilitu proteinu. A ani TCEP již nebyl ke skladovaným proteinům přidáván.

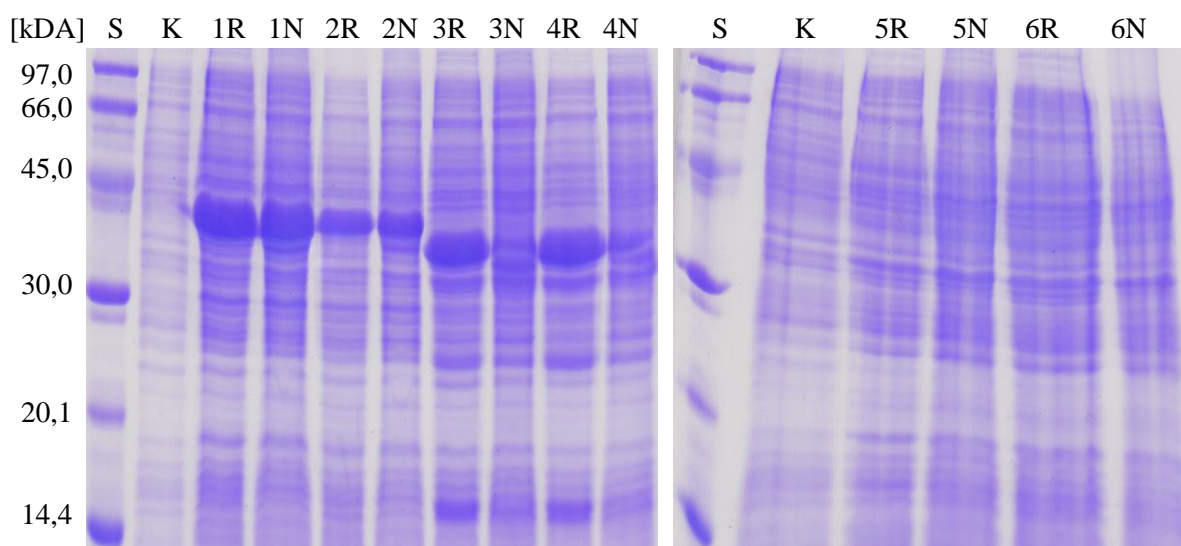


**Obr. 13: Porovnání výsledků skladování u RED CNH pomocí gelové chromatografie.** Analýza uskutečněná na koloně Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL, jako pufr byl použit roztok o složení: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM  $\text{NaN}_3$ , pH=7,5. **Modře** je zobrazen vzorek před mražením (jen s TCEPem), **zeleně** po rozmražení jen s TCEPem, **fialově** s přidavkem 20 % roztoku glycerolu, **červeně** s přidavkem glycinu a **černě** s 10 % roztokem sacharosy.

#### 5.4. Produkce enzymů v expresním systému *E. coli* SHuffle T7 Express

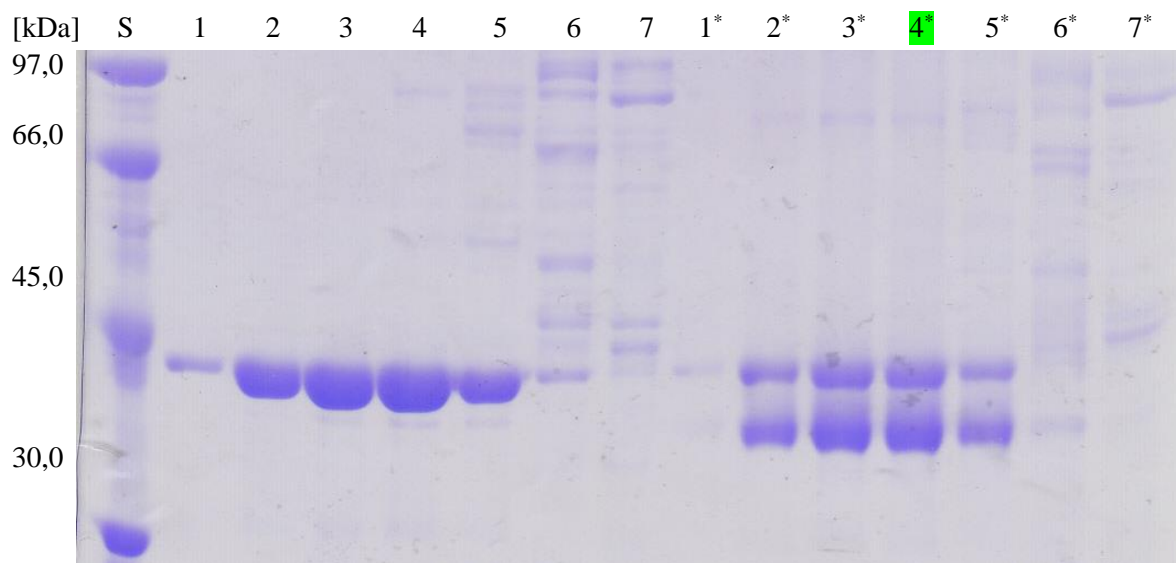
K produkci výše zmíněných enzymů byl využit také expresní systém *E. coli* SHuffle T7 Express, umožňující snadnější tvorbu disulfidických můstků. I když uspořádání vzorků na gelech na obr. 14, kdy byly střídavě umístěny vedle sebe vzorky v redukujícím a neredukujícím prostředí, nebylo příliš vhodné a nelze tedy posuzovat chování preparátů v těchto odlišných prostředích. Lze jednoznačně říct, že bakteriální systém SHuffle T7 Express není vhodný pro produkci nitrilasy z *Aspergillus niger*.

Pro srovnání chování enzymů připravených ve dvou odlišných bakteriálních kmenech, byla z časových důvodů vybrána jen kyanidhydratasa. Při purifikaci CNH produkované v kompetentních buňkách SHuffle T7 Express byl využit stejný postup jako u produkce v buňkách BL21-Gold (DE3).



**Obr. 14: Produkce v buňkách *E. coli* SHuffle T7 Express.** 15 % separační gel. V dráze S je proteinový standard, v dráze K vzorek před indukcí, dráhy 1 a 2 se vztahují k CNH (40 kDa), dráhy 3 a 4 k NitAB (37 kDa), dráhy 5 a 6 k NitAN (36 kDa). Písmeno R označuje vzorky v redukujícím a písmeno N v neredukujícím prostředí.

Na obrázku č. 15 jsou porovnány posbírané frakce při gelové filtraci NERED proteinu v redukujícím a neredukujícím prostředí. Na základě těchto výsledků bylo usouzeno, že by preparát mohl obsahovat intramolekulární disulfid. Předpokládala jsem, že spodní proužek v neredukujícím prostředí obsahuje disulfid, kdežto horní nikoli. Pro potvrzení domněnky bylo část vzorku (frakce 4) podrobena hmotnostní spektrometrické analýze, neboť touto metodou je možné mapovat disulfidické spojení v proteinu.

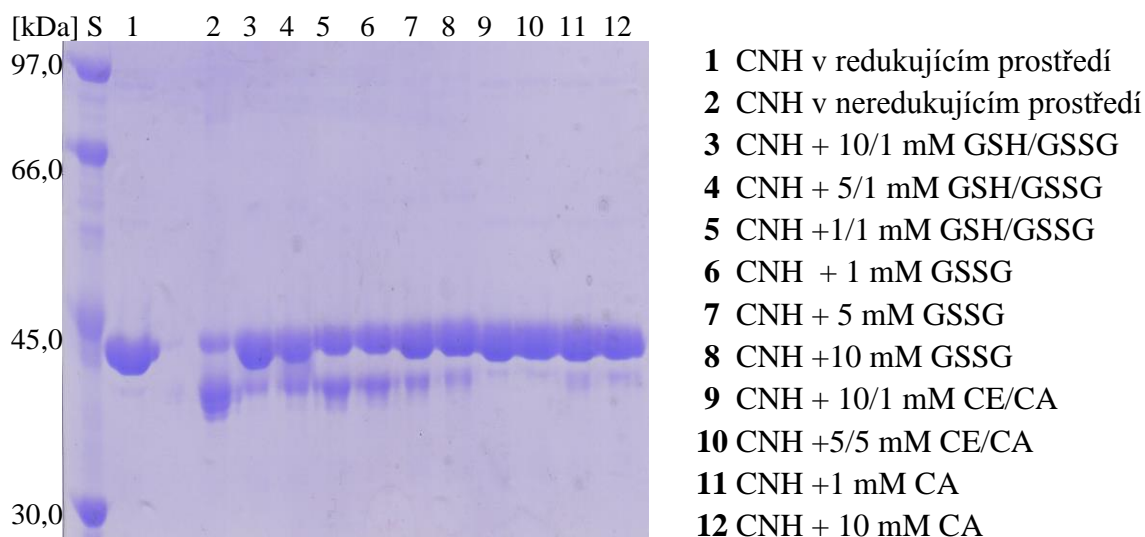


**Obr. 15: SDS-PAGE z frakcí CNH posbíraných při gelové chromatografii.** Použit byl 12,5 % separační gel. V dráze S je proteinový standard, v drahách 1 až 7 vzorky CNH v redukujícím prostředí a v drahách 1\* až 7\* vzorky CNH v neredukujícím prostředí.

Z další částí frakce 4 byl proveden oxidační test, jehož snahou bylo přijít na to, jestli je možné vzorek plně zoxidovat, tzn. uzavřít disulfid. Purifikovaná kyanidhydratasa byla inkubována 1 den v lednici s přidavkem činidel - oxidovaného glutathionu (GSSG), redukovaného glutathionu (GSH), cystamin dihydrochloridu (CA) a cysteamin hydrochloridu (CE) v různých poměrech. Po 24 hodinách byl k vzorkům přidán 5× koncentrovaný vzorkový pufr a směs byla 5 minut povařena ve vodní lázni. Následně byly vzorky naneseny na 12,5 % polyakrylamidový gel a byla provedena elektroforetická analýza.

Jak je patrné z obr. 16, str. 48 poměry proužků se s přidavkem činidel měnily, z toho lze usuzovat, že se opravdu jedná o disulfidický můstek, bohužel namísto oxidace vedl přidavek redoxních činidel spíše k jeho redukci.





**Obr. 16: SDS-PAGE oxidačního testu s frakcí 4 preparátu CNH.** Použit byl 12,5 % separační gel. Drahá S značí proteinový standard, obsah ostatních drah je popsán v legendě.

#### 5.4.1. Hmotnostní spektrometrie

Pro mapování disulfidických vazeb byl enzymový preparát CNH (frakce 4 zobrazená na obr. 14, str. 46) v Laboratoři charakterizace molekulární struktury, MBÚ AV ČR, v.v.i. elektroforeticky separován, následně byly proužky s proteinem vyříznuty a štěpeny trypsinem. Peptidové fragmenty extrahované z gelu byly odsoleny a byla provedena LC-MS analýza.

Z výsledků MS plyne, že kyanidhydratasa opravdu obsahuje ve své sekvenci tři cysteiny a vždy dva vytváří jeden disulfidický můstek, viz tab. 3, str. 49 a obr. 17, str. 49. V horním proužku bylo nalezeno spojení mezi prvním a druhým cysteinem (Cys 41-Cys 165), v dolním proužku mezi prvním a třetím cysteinem (Cys 41-Cys 290).

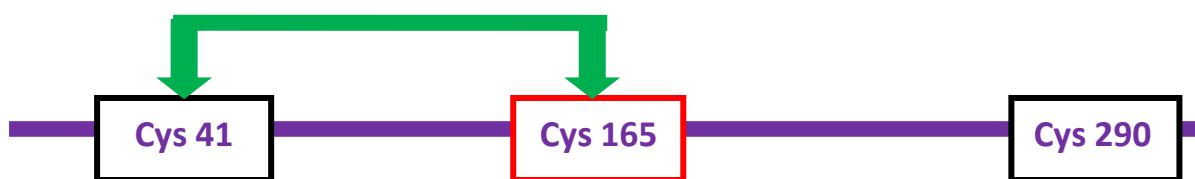


**Tab. 3:** Disulfidické můstky identifikované v CNH pomocí MS.

Experimentální m/z	Teoretická m/z	Chyba [ppm]	Číselná sekvence	Sekvence CNH	Intenzita
2,226.9575	2,226.9551	1,06	39-42,160-174	AGCK- VGHLNCWEN <u>M</u> NP <u>F</u> MK	2,83.10 <sup>8</sup>
2,210.9620	2,210.9602	0,8	39-42,160-174	AGCK- VGHLNCWENMNP <u>F</u> MK	4,59.10 <sup>7</sup>
2,210.9620	2,210.9602	0,8	39-42,160-174	AGCK- VGHLNCWEN <u>M</u> NP <u>F</u> MK	4,59.10 <sup>7</sup>
2,194.9673	2,194.9653	0,89	39-42,160-174	AGCK- VGHLNCWENMNP <u>F</u> MK	1,37.10 <sup>7</sup>
2,583.2049	2,583.2106	2,17	39-42,276-294	AGCK- DFEGLLFVDIDLDECHLSK	4,31.10 <sup>6</sup>
2,583.2153	2,583.2049	1,82	39-42,276-294	AGCK- DFEGLLFVDIDLDECHLSK	3,85.10 <sup>7</sup>

*Poměr hmotností m/z je uveden v Da, podtržení v sekvenci značí oxidaci. První čtyři řádky se vztahují k hornímu proužku v SDS-PAGE (obr. 14, str. 42), dolní dva pod čarou ke spodnímu.*

A)



B)



**Obr. 17:** Schéma zapojení disulfidického můstku u kyanidhydratasy (CNH produkovaná v Shuffle T7 Express). Fialová čára ilustruje celou aminokyselinovou sekvenci proteinu, červený rámeček představuje cystein v aktivním místě enzymu. Část **A)** symbolizuje zapojení -S-S- můstku v horním proužku a **B)** v dolním proužku frakce 4 z obr. 14, str. 46.

Následně byla podrobena MS analýze i čerstvě purifikovaná neredukovaná forma CNH, která byla produkována v buňkách *E. coli* BL21-Gold (DE3). Zde bylo jasně identifikované spojení mezi prvním a třetím cysteinem (Cys 41-Cys 290).

## 5.5. Charakterizace připravených proteinů

### 5.5.1. Specifická enzymová aktivita

Všechny rekombinantně připravené a purifikované proteiny podle výše uvedeného postupu jsou enzymově aktivní. Specifická aktivita kyanidhydratasy z *Aspergillus niger* byla stanovena k KCN jako přirozenému substrátu a nitrilasa z *Arthroderma benhamiae* byla stanovena k fenylacetonitrilu. Naměřená data pro redukované i neredukované proteinové vzorky jsou uvedena v tab. 4. U NitAB a CNH produkované v *E. coli* BL21-Gold (DE3) mají vyšší aktivitu vzorky redukované formy, u CNH produkované v *E. coli* SHuffle T7 Express je tomu naopak.

**Tab. 4:** Stanovené specifické aktivity připravených enzymů.

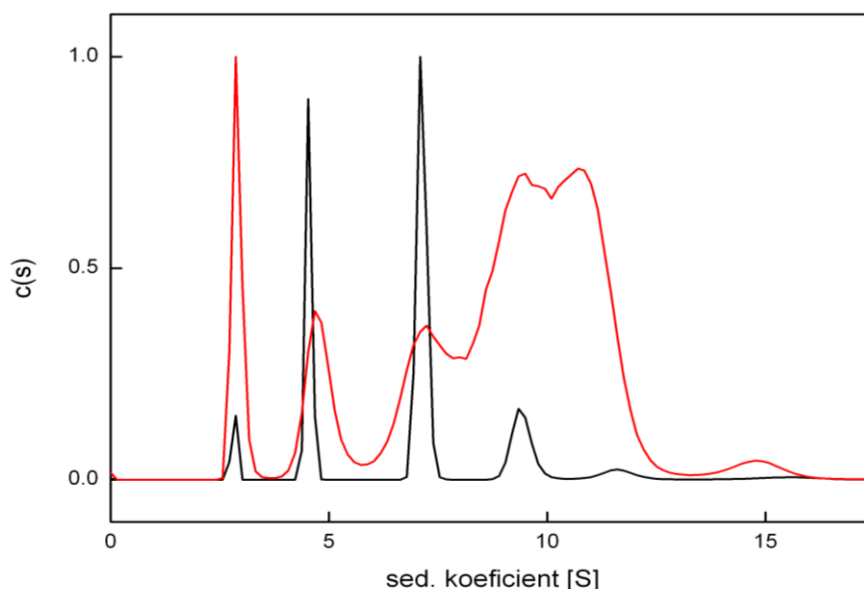
Proteinový vzorek	Enzymová aktivita/ U.mg <sup>-1</sup>
NitAB_N	3,96
NitAB_R	4,40
CNH_G_N	342,16
CNH_G_R	561,76
CNH_S_N	640,52
CNH_S_R	582,30

Písmenem **G** jsou značeny enzymy produkované v buňkách *E. coli* Gold BL21 (DE3) a písmenem **S** v *E. coli* SHuffle T7 Express, **R** značí redukovanou a **N** neredukovanou formu proteinu.

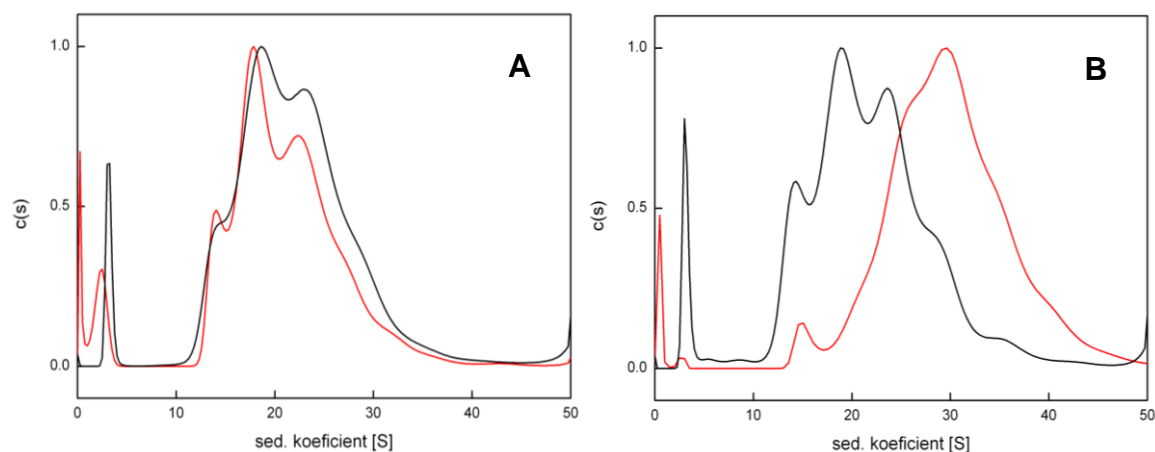
### 5.5.2. Sedimentační analýza

Nitrilasa z *A. benhamiae* a kyanidhydratasa z *A. niger* byly analyzovány pomocí analytické ultracentrifugace metodou sedimentační rychlosti. Oba redukované proteiny vytváří v roztoku směs oligomerů. U měřeného vzorku redukované NitAB o koncentraci 0,4 mg.ml<sup>-1</sup> byl pozorován monomer, dimer, tetramer a hlavní pík odpovídající pravděpodobně hexameru a oktameru s velikostí sedimentačních koeficientů  $s_{20,w} = 3,1 - 5,1 - 7,6 - 9,7$  a 11,5 S (obr. 18, str. 51). NitAB byla měřena v pufru o složení 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH = 7,5 pro neredukovaný vzorek, v redukovaném

byl navíc 10 mM  $\beta$ -ME a v CNH v redukováných formách v pufru o složení 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM  $\text{NaN}_3$ , 10 mM  $\beta$ -ME, pH = 8,5 a neredukované vzorky v pufru o stejném složení, ve kterém byl vynechán pouze  $\beta$ -ME. Při analýze redukované CNH produkované v *E. coli* BL21-Gold (DE3) o koncentraci  $0,75 \text{ mg.ml}^{-1}$  byl rozeznán monomer, oktamer, dodekamer a hexadekamer s velikostí sedimentačních koeficientů  $s_{20,w} = 2,5 - 14,9 - 18,8$  a  $23,6 \text{ S}$ , u neredukované formy o koncentraci  $0,84 \text{ mg.ml}^{-1}$  ty samé útvary s velikostí sedimentačních koeficientů  $s_{20,w} = 3,36 - 14,7 - 19,7$  a  $25 \text{ S}$ . U měřeného vzorku CNH produkovaného v *E. coli* SHuffle T7 Express pro redukovanou formu o koncentraci  $0,93 \text{ mg.ml}^{-1}$  byla zaznamenána heterogenní směs oligomerů o průměrné hodnotě sedimentačního koeficientu okolo  $30 \text{ S}$  a pro neredukovanou formu o koncentraci  $0,55 \text{ mg.ml}^{-1}$  byl zaznamenán opět monomer, oktamer, dodekamer a hexadekamer se sedimentačními koeficienty  $s_{20,w} = 3,33 - 14,6 - 19,9$  a  $24,6 \text{ S}$  (obr. 19, str. 52).



**Obr. 18: Sedimentační analýza NitAB.** Normalizovaná distribuce sedimentačních koeficientů pro **neredukovaný** a **redukováný** enzym. Pozorované částice odpovídají (zleva doprava) monomeru, dimeru, tetrameru, hexameru a oktameru NitAB.



**Obr. 19: Sedimentační analýza CNH.** Normalizovaná distribuce sedimentačních koeficientů pro **neredukovaný** a **redukovaný** enzym, A) produkce v *E. coli* BL21-Gold (DE3); B) produkce v *E. coli* SHuffle T7 Express.

### 5.5.3. Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků

Metoda DCDR byla využita pro stanovení obsahu sekundárních struktur proteinů. Analýza byla provedena podle postupu popsaném v oddíle 4.4.7. Získaná data jsou uvedena v tab. 5, str. 52. Z výsledků vyplývá, že redukce nemá na sekundární strukturu těchto proteinů významný vliv. Pro ilustraci byla vybrána jedna fotografie kapky NERED CNH produkované v *E. coli* SHuffle T7 Express viz obr. 20, str. 53 a na obr. 21, str. 54 jsou uvedena Ramanova spektra redukovaného i neredukovaného vzorku NitAB, vyjádřená jako závislost intenzity signálu na vlnočetu.

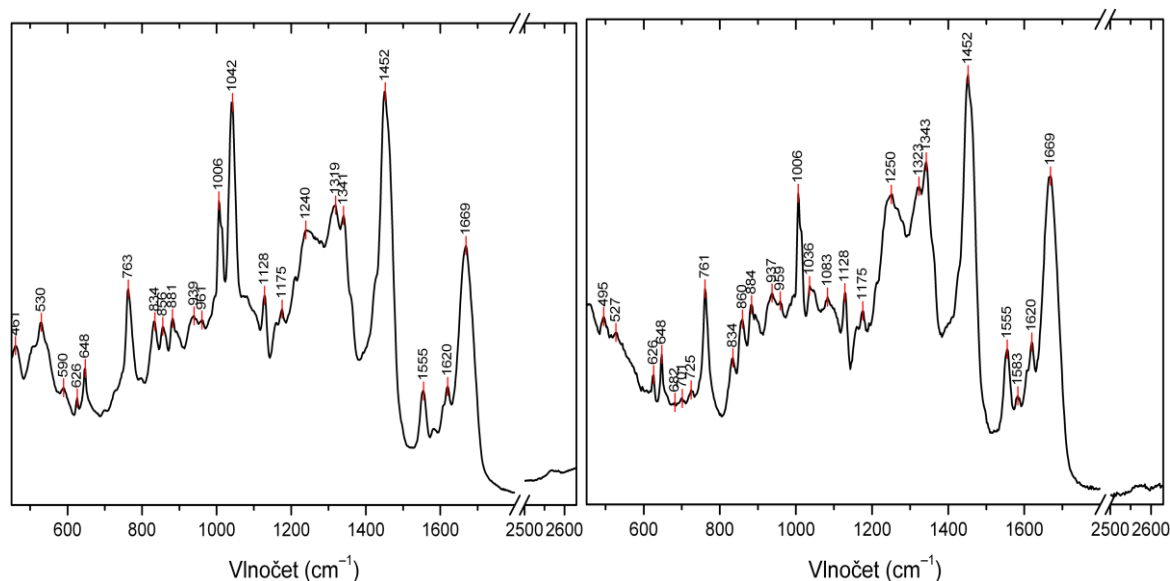
**Tab. 5:** Zastoupení prvků sekundárních struktur nalezených pomocí DCDR.

Enzym	Struktura				
	$\alpha$ -helix	$\beta$ -list	$\beta$ -otočka	Neuspořádaná struktura	Celkem
<b>NitAB_N</b>	19 %	48 %	19 %	11 %	97 %
<b>NitAB_R</b>	16 %	48 %	19 %	10 %	93 %
<b>CHN_G_N</b>	21 %	43 %	18 %	10 %	92 %
<b>CNH_G_R</b>	20 %	43 %	18 %	9 %	90 %
<b>CNH_S_N</b>	24 %	42 %	18 %	10 %	94 %
<b>CNH_S_R</b>	20 %	42 %	19 %	10 %	91 %
<b>Chyba</b>	5 %	4 %	2 %	2 %	

*Písmenem G jsou značeny enzymy produkované v buňkách E. coli Gold BL21 (DE3) a písmenem S v E. coli SHuffle T7 Express, R značí redukovanou a N neredukovanou formu proteinu. Chyba se týká referenční sady spekter použité pro predikci prvků sekundární struktury z pásu amidu I, nikoli vlastního měření.*



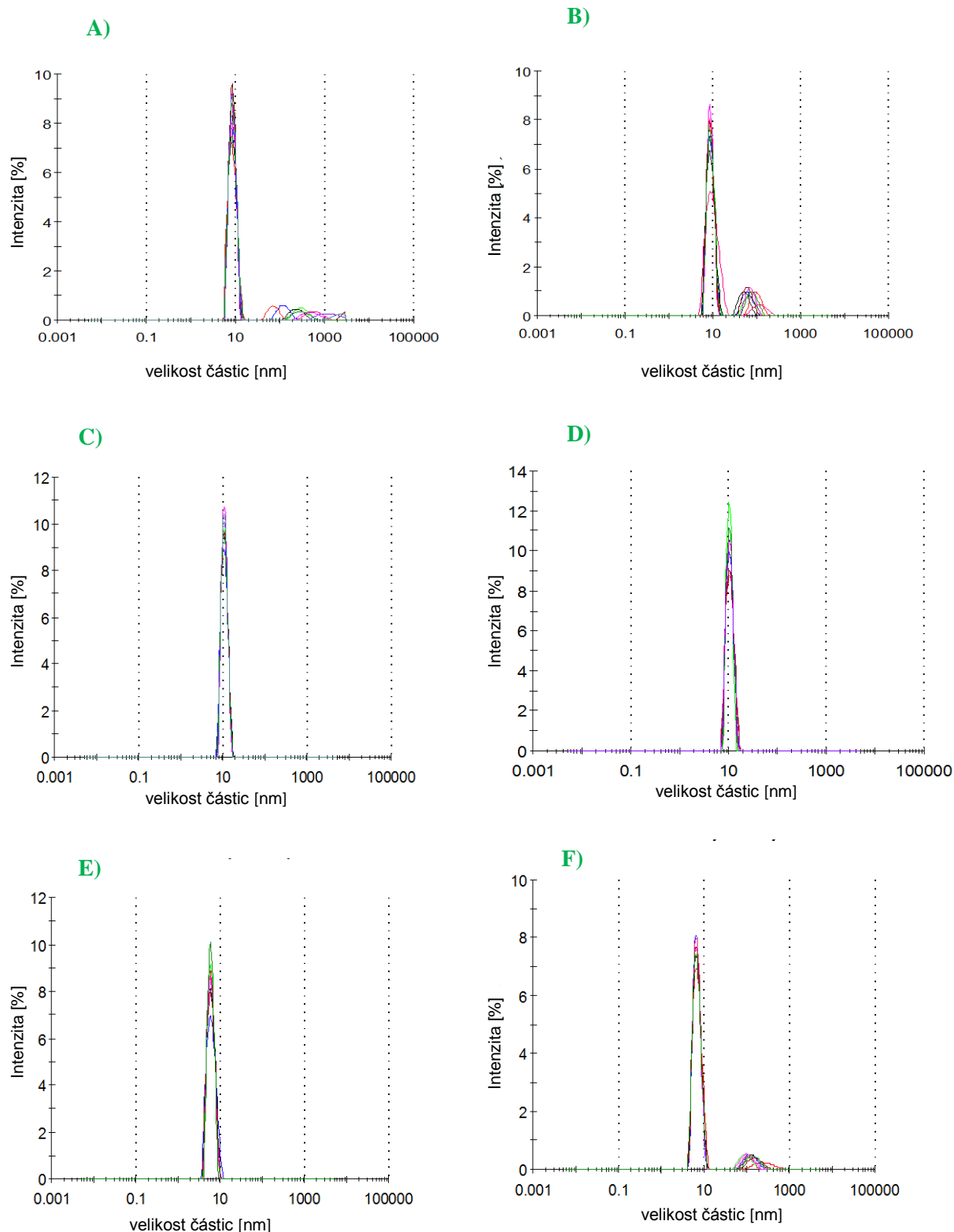
**Obr. 20:** Kapka neredukované CNH produkované v *E. coli* SHuffle T7 Express. Rámečkem je přibližně vyznačena oblast, v níž v kapkově nanášeném povlaku probíhá měření Ramanových spekter. Skutečná měřená oblast však byla mnohem menší (průměr 0,9  $\mu\text{m}$ ), protože k měření byl využit Ramanův mikroskop.



**Obr. 21: Ramanova spektra NitAB.** Vlevo pro redukovaný a vpravo pro neredukovaný vzorek. Pás amidu I, dle jehož tvaru byla predikována sekundární struktura proteinu, se nachází v oblasti  $1660\text{ cm}^{-1}$ .

### 5.5.3. Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla byl využit pro získání informace o stupni disperzity vzorků, tedy o možném výskytu oligomerních nebo agregovaných forem. Měřeny byly vzorky o koncentraci  $0,5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  dle postupu uvedeném odstavci 4.4.6. Obr. 22, str. 55. U kyanidhydratasy z *Aspergillus niger* produkované v *E. coli* BL-21 Gold (DE3) byla analýzou DLS prokázána přítomnost oligomerů o 10-15 jednotkách. V neredukované formě proteinu je vysokomolekulární populace velice různorodá, zatímco u redukované se stane více homogenní. Podle výsledků DLS je produkce kyanidhydratasy v *E. coli* SHuffle T7 Express mnohem homogennější. V redukované formě tvoří oligomery o 15-22 jednotkách, v neredukované o 15-25 jednotkách. Nitrilasa z *Arthroderma benhamiae* tvoří v redukované i neredukované formě populaci oligomerů o 5-7 jednotkách, neredukovaný vzorek je však více homogenní.

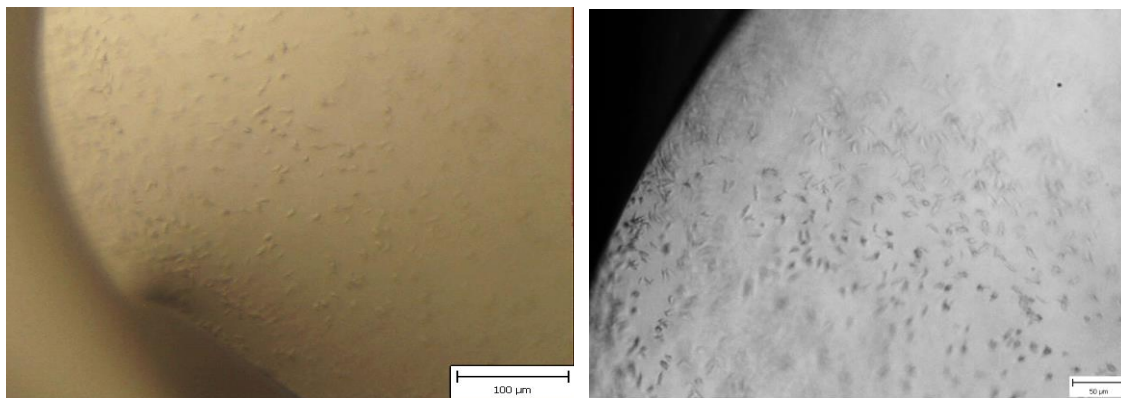


**Obr. 22: Výsledky měření dynamického rozptylu světla připravených enzymů. A)** NERED CNH v *E. coli* BL21-Gold (DE3); **B)** RED CNH v *E. coli* BL21-Gold (DE3); **C)** NERED CNH v *E. coli* SHuffle T7 Express; **D)** RED CNH v *E. coli* SHuffle T7 Express; **E)** NERED NitAB v *E. coli* BL21-Gold (DE3); **F)** RED NitAB v *E. coli* BL21-Gold (DE3); v každém grafu je zobrazeno 10 jednotlivých měření.

## 5.6. Krystalizace proteinů

Krystalizační experimenty s redukovanou kyanidhydratasou z *Aspergillus niger* produkovanou v *E. coli* BL21-Gold (DE3) započaly v březnu letošního roku. Frakce po gelové chromatografii ověřené na SDS-PAGE byly spojeny a zakonzentrovány na  $18 \text{ mg.ml}^{-1}$ . V této koncentraci byla nasazena jedna destička s podmínkami krystalizační sady JCSG Core I Suite a protože při prvním prohlížení převažovaly spíše sraženiny, byl proteinový vzorek naředěn na  $14 \text{ mg.ml}^{-1}$  a v této koncentraci byly nasazeny další 4 desky s komerčními sadami JCSG Core I až IV Suites. Jednotlivé krystalizační kapky byly vytvořeny smícháním 200, 150 nebo 100 nl proteinového preparátu s 100, 150 nebo 200 nl daného rezervoáru, z jedné podmínky tak vznikly tři kapky: nahoře v poměru proteinový roztok: rezervoáru 2:1, uprostřed 1:1 a dole 1:2.

Bohužel kyanidhydratasa dosud nevytvořila dostatečně velké monokrystaly v žádné z testovaných podmínek. Po 15 dnech však byl pozorován mikrokrytalický precipitát proteinu ( $14 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) v JCSG Core II Suite v místě A5 dole s podmínkou 0,1 M Bicin pH = 9,0; 10 % PEG 20 000; 2 % Dioxan (obr. 23). Tyto útvary byly pozorovány ještě po 23 dnech od nasazení krystalizačních kapek, nicméně po 30 dnech došlo k jejich rozpuštění.



**Obr. 23: Snímky útvarů pozorovaných při pokusech krystalizace redukováného vzorku CNH.** Útvary vyrostly ze směsi proteinu o koncentraci  $14 \text{ mg.ml}^{-1}$  v pufru se složením 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM  $\text{NaN}_3$ , 10 mM  $\beta$ -Me, pH = 8,5 a podmínky komerční sady JCSG Core II Suite s obsahem 0,1 M Bicin pH=9,0; 10 % PEG 20000; 2 % Dioxan. Obrázek vlevo byl pořízen po 15 dnech, vpravo po 23 dnech od nasazení kapek.

První pokusy o krystalizaci redukováné nitrilasy z *Arthroderma benhamiae* začaly již v loňském roce Mgr. Janem Bláhou s vyčištěným enzymovým preparátem, jež připravil David Illěš [55]. Nasazován byl proteinový vzorek o koncentraci  $10 \text{ mg.ml}^{-1}$  v pufru o složení 10 mM HEPES; 150 mM NaCl; 10 mM  $\text{NaN}_3$ ; 10 mM  $\beta$ -ME; pH = 7,5 s různými



komerčními sadami. Jednotlivé krystalizační kapky byly vytvořeny smícháním 150, 150 nebo 200 nl proteinového preparátu s 200, 150 nebo 150 nl daného rezervoáru, z jedné podmínky tak vznikly tři kapky: nahoře v poměru proteinový roztok: rezervoáru 3:4, uprostřed 1:1 a dole 4:3. Mezi 10 a 14 dnem od počátku experimentů, se objevily drobné mikrokrytality v několika podmínkách:

- Sada **JCSG Core II Suite**:

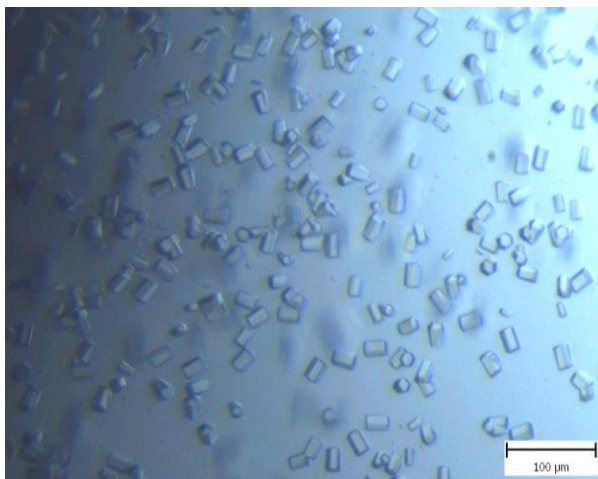
- 1) v A8 dole: 100 mM Tris pH=8,5; 5 % PEG 8000; 20 % PEG 300; 10 % glycerol
- 2) v E4 uprostřed a dole: 1 M LiCl<sub>2</sub>; 100 mM MES pH = 6,0; 10 % PEG 6000

- Sada **JCSG + Suite**:

- 1) B4 nahoře a uprostřed: 100 mM HEPES pH = 7,5; 10 % PEG 8000; 8 % ethylenglykol
- 2) G4 uprostřed a dole: 200 mM TMAO; 100 mM Tris pH = 8,5; 20 % PEG MME 2000

Snímek krystalů v jedné z těchto podmínek je uveden na obr. 24.

V případě nitrilasy z *Arthroderma benhamiae* již probíhá optimalizace krystalizačních podmínek. Problematikou se zabývá Mgr. Jan Bláha.



**Obr. 24: Krystaly redukované NitAB.** Tyto útvary vyrostly ze směsi proteinu o koncentraci 10 mg.ml<sup>-1</sup> a podmínky sady JCSG+ Suite se složením 200 mM TMAO; 100 mM Tris pH = 8,5; 20 % PEG MME 2000.

## 6. Diskuse

Předkládaná diplomová práce se zabývá přípravou a studiem vlastností nitrilasy z *Arthroderma benhamiae* a kyanidhydratasy z *Aspergillus niger* K10. Oba tyto enzymy patří do skupiny nitrilas, jež náleží do nitrilasové superrodiny.

Prvním krokem mé práce bylo naprodukovat příslušné enzymy ve zvoleném bakteriálním kmeni *E. coli* BL21-Gold (DE3). Kultivace proběhla v LB médiu, kde je nutná indukce IPTG v době, kdy se buňky nachází v exponenciální fázi růstu. Po úspěšné produkci jsem přešla k dalšímu dílčímu úkolu a to k purifikaci rekombinantních enzymů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Tento krok již byl časově náročnější a to zejména u kyanidhydratasy, se kterou se v naší laboratoři pracovalo poprvé. Bylo zapotřebí vyzkoušet několik kolon a různé složení pufrů s vhodně zvolenou hodnotou pH. Z optimalizačních pokusů vyplynul jako nejideálnější postup použít iontově výměnnou chromatografii na Q-Sepharose FF, kdy byl proteinový vzorek nanášen na kolonu ekvilibrovanou při pH 6,5. Při této hodnotě pH měl protein celkový záporný náboj, neboť teoretická hodnota izoelektrického bodu je 5,43, a vázal se na anexové koloně. Eluce byla následně provedena zvýšením iontové síly, konkrétně gradientem chloridu sodného. V tomto purifikačním kroku byla odstraněna ze vzorku velká část nečistot a k dočištění byla použita gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 200. U nitrilasy byla nutná tříkroková purifikace, sestávající ze dvou iontově výměnných chromatografií (Q-Sepharosa FF a Source 15Q) a jedné gelové filtrace (Superdex 200), zde jsem vycházela z purifikačního protokolu Davida Illéše [55], který jsem mírně upravila (přídavek inhibitorů proteas a optimalizace gradientové eluce u iontově výměnných chromatografií).

Při hledání optimálních podmínek purifikace kyanidhydratasy byla v prvním purifikačním kroku zkoušena i hydrofobní chromatografie, a to na různých kolonkách komerční sady HiTrap HIC Selection Kit (*GE Healthcare*), konkrétně: Phenyl Sepharosa HP, Butyl HP, Butyl-S FF a Octyl FF. Ovšem lepšího purifikačního účinku tak nebylo dosaženo.

Při gelové filtraci byl původně používán u obou enzymů HEPES pufr (10 mM HEPES; 150 mM NaCl; 10 mM NaN<sub>3</sub>; 10 mM β-ME; pH = 7,5), později Tris pufr (20 mM Tris; 150 mM NaCl; 10 mM NaN<sub>3</sub>; 10 mM β-ME; pH = 8,5) s cílem zvýšit pH pufru o jednotku, aby došlo ke zvětšení náboje proteinů a tím i k jejich stabilizaci při jejich uchovávání.

Dosud se však nepodařilo vyřešit dlouhodobější skladování těchto enzymů, což do velké míry komplikuje jejich další analýzu.

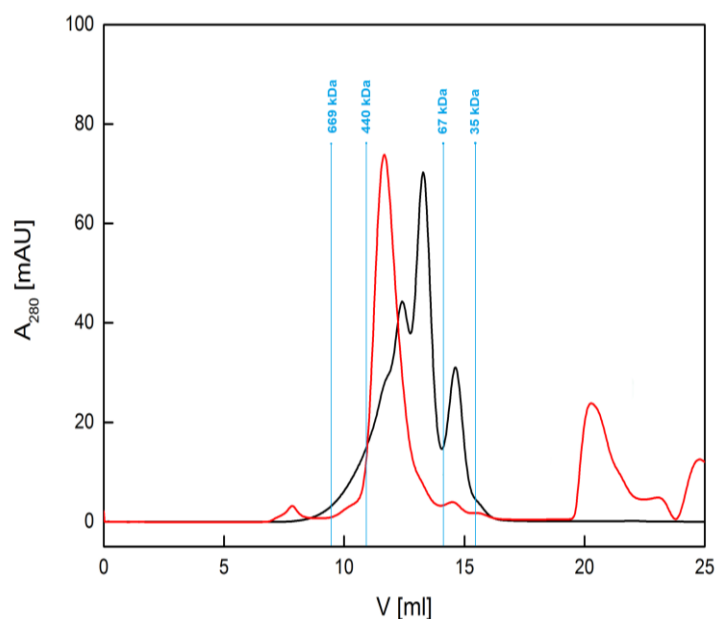
Kromě heterologní produkce proteinů v kompetentních buňkách *E. coli* BL21-Gold (DE3) byla zkoušena produkce v *E. coli* SHuffle T7 Express, jelikož oba zmíněné enzymy obsahují ve své primární sekvenci několik cysteinů a tento bakteriální kmen byl navržen k tomu, aby podporoval tvorbu disulfidických vazeb. Buňky tohoto kmene obsahují delece genů reduktas *trxB* (thioredoxinu) a *gor* (glutathionu) a navíc exprimují speciální disulfidisomerasu DsbC, která v cytoplasmě působí jako chaperon a podporuje přeskupování nesprávně složených disulfidických vazeb [57-58].

Během purifikačního procesu nebyly v chování mezi redukovanými a neredukovanými proteiny zaznamenány žádné větší odchylky. Jen u nitrilasy z *Arthroderma benhamiae* byla pozorována na SDS-PAGE v neredukujícím prostředí u neredukovaného vzorku navíc vyšší oligomerní forma, dimer s velikostí kolem 75 kDa (viz obr. 9, str. 42), patrně spojený intermolekulárním disulfidickým můstkem. U kyanidhydratasy byly zaznamenány také změny na SDS-PAGE po gelové permeační chromatografii v neredukujícím prostředí u neredukovaného vzorku a to u CNH produkované v *E. coli* BL21-Gold (DE3) i v *E. coli* SHuffle T7 Express (viz obr. 12, str. 44 a obr. 15, str. 47). V tomto případě jde o spojení přes intramolekulární disulfidický můstek, což bylo potvrzeno hmotnostní spektrometrií. Rozdíly mezi kyanidhydratasou produkovanou v kmenech SHuffle a Gold se nevyskytly ať již v chromatografickém záznamu (tvar elučních vrcholů, retenční čas) nebo na elektroforéze. Tato skutečnost je zřejmě dána tím, že CNH obsahuje ve své aminokyselinové sekvenci jen tři cysteiny.

Následně jsem přistoupila k charakterizaci proteinů. Nejprve byla změřena specifická aktivita, abych zjistila, jestli jsou vůbec rekombinantně připravené enzymy aktivní. Specifická aktivita byla potvrzena u všech vzorků. Naměřené hodnoty byly ale nižší v porovnání s výsledky, které uvádí publikované zdroje. U NitAB mého redukovaného vzorku byla naměřená hodnota 4,4 U.mg<sup>-1</sup>, u vzorku Davida Illéše 15,5 U.mg<sup>-1</sup> [55] a u neredukované formy kolegové v Laboratoři biotransformací, MBÚ AV ČR, v.v.i naměřili aktivitu 16,3 U.mg<sup>-1</sup> [15]. Tento pokles může být dán nestabilitou enzymů, protože vzorky nebyly podrobeny analýze hned po jejich purifikaci. Podíváme-li se na hodnoty redukovaných a neredukovaných preparátů v tab. 4 na str. 49, vidíme očekávaný trend, kdy neredukované formy enzymů mají nižší specifickou aktivitu než redukované. Výjimkou je jen CNH produkovaná v *E. coli* SHuffle T7 Express, tato data by

bylo vhodné ještě přeměřit s čerstvě připraveným preparátem. Ale rozdíly mezi redukovanými a neredukovanými formami v rámci jednoho druhu enzymu nejsou příliš vysoké. Z toho je možné vyvodit závěr, že redukce u těchto proteinů nemá příliš velký vliv na jejich celkovou strukturu, což bylo následně potvrzeno i Ramanovou spektroskopií, viz tab. 5, str. 53.

Dále byly proteinové vzorky podrobeny sedimentační analýze a dynamickému rozptylu světla. Cílem těchto experimentů bylo zjistit oligomerní stav nitrilasy z *Arthroderma benhamiae* a kyanidhydratasy z *Aspergillus niger*. Obě metody jednoznačně potvrzují výskyt těchto proteinů ve vyšších oligomerních stavech a také to, že redukce má jistý pozitivní vliv na homogenitu enzymů. Z dat získaných sedimentační analýzou vidíme nejnápadnější rozdíly mezi redukovanou a neredukovanou formou u NitAB (obr. 18, str. 51) a u CNH produkovanou v *E. coli* SHuffle T7 Express (obr. 19, str. 52). I když v této studii nebyly prokázány změny mezi redukovanou a neredukovanou formou NitAB u gelové filtrace (viz obr. 8, str. 41), neshodují se výsledky s daty uváděnými v práci Davida Illéše (obr. 25, str. 61). Domnívám se, že jsou tyto odlišnosti dány dobou analýzy, neboť analýza provedená Davidem Illéšem byla provedena s neredukovaným vzorkem, který byl již nějakou dobu skladován, zatímco zde jsou prezentována data vzorku hned po jeho purifikaci. U tohoto enzymu má tedy redukce vliv na jeho oligomerní stav.



Obr. 25: **Záznam z gelové filtrace pro NitAB.** Separace proběhla na koloně Superdex™ 200 10/300 GL. Červená křivka zobrazuje RED vzorek, černá RED vzorek, modře je vyznačena kalibrace použité kolony v závislosti elučního objemu a molekulární hmotnosti, kterou uvádí výrobce. Obrázek je převzat z [55].

S redukovanými proteiny NitAB a CNH byly provedeny první krystalizační pokusy. U kyanidhydratasy dosud nebyly získány žádné krystaly, s nitrilasou z *Arthroderma benhamiae* již probíhá optimalizace krystalizačních podmínek, v nichž NitAB krystalizuje, avšak její krystaly jsou zatím malé a nejsou schopné difrakce v rentgenovém záření nezbytné k vyřešení prostorové struktury proteinů pomocí proteinové krystalografie. Optimalizace krystalizačních podmínek proteinů je velice zdoluhavý proces, při kterém se postupně mění řada faktorů, mezi nejdůležitější patří koncentrace proteinu či srážedla, pH, poměr srážedla a proteinu v krystalizační kapce nebo teplota.

## 7. Závěr

- Heterologní exprese v bakteriích *E. coli* BL21-Gold (DE3) a *E. coli* SHuffle T7 Express byla připravena kyanidhydratasa z *Aspergillus niger* K10 a nitrilasa z *Arthroderma benhamiae*.
- Připravené enzymy byly purifikovány z rozpustné frakce sérií kapalinových chromatografií v redukujících i neredukujících podmínkách.
- Redukce kyanidhydratasy z *Aspergillus niger* K10 nevede k podstatné změně její aktivity, oligomerního stavu ani její sekundární struktury.
- Redukce nitrilasy z *Arthroderma benhamiae* nevede k podstatné změně její aktivity ani její sekundární struktury, ovlivňuje však její oligomerní stav.

## Seznam použité literatury a zdrojů

- [1] Howden, A.J.M., Preston, G.M.: *Microb. Biotechnol.* 2, 441-451 (2009)
- [2] Banerjee, A., Sharma, R., Banerjee, U.C.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 33-44 (2002)
- [3] Gong, J.-S., Lu, Z.-M., Li, H., Shi, J.-S., Zhou, Z.-M., Xu, Z.-H.: *Microbial Cell Factories* 11, 1-18 (2012)
- [4] Pace, H.C., Brenner, C.: *Genome Biol.* 2, 0001.1-0001.9 (2001)
- [5] Nakai, T., Hasegawa, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Ueki, T., Nanba, H., Ikenaka, Y., Takahashi, S., Sato, M., Tsukihara, T.: *Structure* 8, 729-737 (2000)
- [6] Brenner, C.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 775-782 (2002)
- [7] Thuku, R.N., Brady, D., Benedik, M.J., Sewell, B.T.: *J. Appl. Microbiol.* 106, 703-727 (2009)
- [8] Pace, H.C., Hodawadekar, S.C., Draganescu, A., Huang, J., Bieganski, P., Pekarsky, Y., Croce, C.M., Brenner, C.: *Curr. Biol.* 10, 907-917 (2000)
- [9] Thimann, K., Mahadevan, S.: *Nature* 181, 1466-1467 (1958)
- [10] Thimann, K., Mahadevan, S.: *Arch. Biochem. Biophys.* 105, 133-141 (1964)
- [11] Robinson, W.G., Hook, R.K.: *J. Biol. Chem.* 239, 4257-4262 (1964)
- [12] Kaplan, O., Veselá, A.B., Petříčková, A., Pasquarelli, F., Pičmanová, M., Rinágelová, A., Bhala, T.Ch., Pátek, M., Martínková, L.: *Mol. Biotechnol.* 54, 996-1003 (2013)
- [13] Kaplan, O., Bezouška, K., Malandra, A., Veselá, A.B., Petříčková, A., Felsberg, J., Rinágelová, A., Křen, V., Martínková, L.: *Biotechnol. Lett.* 33, 309-312 (2011)
- [14] Petříčková, A., Veselá, A.B., Kaplan, O., Kubáč, D., Uhnáková, B., Malandra, A., Felsberg, J., Rinágelová, A., Weyrauch, P., Křen, V., Bezouška, K., Martínková, L.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 1553-1561 (2012)

- [15] Veselá, A.B., Petříčková, A., Weyrauch, P., Martínková, L.: *Biocatal. Biotransform.* 31, 49-56 (2013)
- [16] Almatawah, Q.A., Cramp, R., Cowan, D.A.: *Extremophiles* 3, 283-289 (1999)
- [17] Šnajderová, R., Kristová-Mylerová, V., Crestia, D., Nikolaou, K., Lemaire, M., Gallienne, E., Bolte, J., Bezouška, K., Křen, V., Martínková, L.: *J. Catal.* 29, 227-232 (2004)
- [18] McBride, K.E., Kenny, J.W., Stalker, D.M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 325-330 (1986)
- [19] O'Reilly, C., Turner, P.D.: *J. Appl. Microbiol.* 95, 1161-1174 (2003)
- [20] Bhalla, T.C., Miura, A., Wakamoto, A., Ohba, Y., Furuhashi, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 184-190 (1992)
- [21] Harper, D.B.: *Biochem. J.* 167, 685-692 (1977)
- [22] Layh, N., Parrat, J., Willetts, A.: *J. Mol. Catal. B* 5, 467-474 (1998)
- [23] Kaplan, O., Vejvoda, V., Plíhal, O., Pompach, P., Kavan, D., Bojarová, P., Bezouška, K., Macková, M., Cantarella, M., Jirků, V., Křen, V., Martínková, L.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 567-575 (2006)
- [24] Fry, W.E., Millar, R.L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 151, 468-474 (1972)
- [25] Basile, L.J., Willson, R.C., Sewell, B.T., Benedik, M.J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 427-435 (2008)
- [26] Rinágelová, A., Kaplan, O., Veselá, A.B., Chmátal, M., Křenková, A., Plíhal, O., Pasquarelli, F., Cantarella, M., Martínková, L.: *Process Biochem.* 49, 445-450 (2014)
- [27] McMurry, J.: *Organická chemie*, Nakladatelství VUTIUM, Brno/VŠCHT, Praha (2007)
- [28] Yamamoto, K., Ueno, Y., Otsubo, K., Kawakami, K., Komatsu, K.: *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3125-3129 (1990)



- [29] Yamamoto, K., Oishi, K., Fujimatsu, I., Komatsu, K.: Appl. Environ. Microbiol. 57, 3028–3032 (1991)
- [30] Matthew, C., Nagasawa, T., Kobayashi, M., Yamada, H.: Appl. Environ. Microbiol. 54, 1030–1032 (1998)
- [31] NCBI, dostupné z:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=425011&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> (16.11.2013)
- [32] Klaban, V.: Ilustrovaný mikrobiologický slovník, Nakladatelství Galén, Praha (2005)
- [33] Chumlová, J., Němec, M., Kotoučková, L., Páčová, Z., Kubátová, A., Savická, D.: Miniatlasy mikroorganismů, dostupné z:  
<https://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm> (přístup 1.1.2014)
- [34] Schuster, E., Dunn-Coleman, M., Frisvad, J.C., van Dijck, P.W.M.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 59, 426–435 (2002)
- [35] Backer, S.E.: Med. Mycol. 44, 17–21 (2006)
- [36] Pel, H.J., de Winde, J.H., Archer, D.B., Dyer, P.S., Hofmann, G., Schaap, P.J., Turner, G., de Vries, R.P., Albang, R., Albermann, K., et al.: Nat. Biotechnol. 25, 221–231 (2007)
- [37] Biotechnology Program under the Toxic Substances Control Act, dostupné z:  
[http://epa.gov/biotech\\_rule/pubs/fra/fra006.htm](http://epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra006.htm) (16.11.2013)
- [38] dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=663331> (přístup 21.12.2013)
- [39] Říhová Ambrožová, J.: Mikrobiologie v technologii vod, VŠCHT, Praha (2008)
- [40] Burmester, A., Shelest, E., Glöckner, G., Heddergott, Ch., Schindler, S., Steib, P., Heidel, A., Petrold, A., Szafranski, K., Feuermann, M., Pedruzzi, I., Priebe, S., Groth, M., Winkler, R., Li, W., Knemeyer, O., Schroeckh, V., Hertweck, Ch., Hube, B., White, T., Platzer, M., Guthke, R., Heitman, J., Wöstemeyer, J., Zipfel, P.J., Monod, M., Brakhage, A.A.: Genome Biol. 12, 1–16 (2011)

- [41] Fumeaux, J., Mock, M., Ninet, B., Jan, I., Bontems, O., Léchenne, B., Lew, D., Panizzon, R.G., Jousson, O., Monod, M.: *Dermatology* 208, 244-250 (2004)
- [42] Staib, P., Zaugg, Ch., Mignon, B., Weber, J., Grumbt, M., Pradervand, S., Harshman, K., Monod, M.: *Microbiology* 156, 884-895 (2010)
- [43] Kaplan, O., Vejvoda, V., Plíhal, O., Pompach, P., Kavan, D., Bojarová, P., Bezouška, K., Macková, M., Cantarella, M., Jirků, V., Křen, V., Martínková, L.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 3745-3746 (2013)
- [44] Studier, F.W., Moffatt, B.A.: *J. Mol. Biol.* 189, 113-130 (1986)
- [45] pET system manual, Novagen, 11.vydání (2005). Dostupné z: [http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen\\_petsystem.pdf](http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf) (23.9.2013)
- [46] Nucleic Acids Calculator, dostupné z: <http://www.kenkyuu.net/js/nacalc.html> (23. 9. 2013)
- [47] Protokol k izolaci DNA - Pure Link™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit, Invitrogen, (2011). Dostupné z: [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink\\_hipure\\_plasmid\\_filter\\_purification\\_man.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink_hipure_plasmid_filter_purification_man.pdf) (23.9.2013)
- [48] Laemmli, U.K.: *Nature* 277, 680-685 (1970)
- [49] Vaněk, O., Bezouška, K.: *Chem. Listy* 104, 1155-1162 (2010)
- [50] Program SENDTERP, dostupné z: <http://www.jphilo.mailway.com/default.htm> (4.3.2014)
- [51] Schuck, P.: *Biophys.J.* 78, 1606-1619 (2000), program dostupný z: <http://www.analyticalultracentrifugation.com/default.htm> (4.3.2014)
- [52] Pompach, P., Man, P., Kavan, D., Hofbauerová, K., Kumar, V., Bezouška, K., Havlíček, V., Novák, P.: *J. Mass. Spectrom.* 44, 1571-1578 (2009)
- [53] Deegan, R.P., Bakajin, O., Dupont, T.F., Huber, G., Nagel, S.R., Whitten, T.A.: *Natura* 389, 827-829 (1997)
- [54] Berjot, M., Marx, J., Alix, A.J.P.: *J. Raman Spectrosc.* 18, 289-300 (1987)

- [55] Illéš, D.: Optimalizace a purifikace rekombinantní nitrilasy z *Arthroderma benhamiae*. Bakalářská práce, PřF UK, katedra analytické chemie, Praha (2013)
- [56] ExPASy, Copumte pI/Mw, dostupné z: [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/) (4.3.2014)
- [57] Bessete, P.H., Aslund, F., Beckwith, J., Georgiou, G.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 13703-13708 (1999)
- [58] Chen, J., Song, J.L., Zhang, S., Wang, Y., Cui, D.F., Wang, C.C.: J. Biol. Chem. 274, 19601-19605 (1999)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]